

# **Molekylær farmakodynamikk hos levertransplanterte: IMPDH og purinbaser som mulige biomarkører for mykofenolats effekt**

Masteroppgave i farmakologi

Ali Mohamad Ali



Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo

Avdeling for medisinsk biokjemi  
Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet  
15. mai 2011

## **Forord**

Oppgaven ble utført høsten 2010 og våren 2011 ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Denne oppgaven inkluderte en validering av en analysemetode utviklet av Nils Tore Vethe og en farmakologisk studie hos 20 levertransplanterte pasienter. Denne studien ble utført i samarbeid med anestesilege Pål A. Reine, Ulf E. Kongsgaard og Pål-Dag Line. Jeg vil dermed rette en takk til Pål som samarbeidet med oss gjennom denne studien og som var ansvarlig for prøveanskaffelse. Takk til min interne veileder professor Anders Åsberg.

Videre vil jeg takke min meget dyktige og flinke veileder Nils Tore Vethe for god og pedagogisk veiledning. Jeg har lært utrolig mye av deg gjennom dette året og du har alltid vært en god veileder som motiverte og inspirerte meg i dette arbeidet. Jeg vil også takke professor Stein Bergan for gode råd og inspirasjon gjennom alle møtene og kollokviene vi har hatt sammen.

Resten av forskningsgruppen: Sara Bremer, Ingjerd Sæves, Helge Rootwelt, Ragnhild Skauby, Anders Andersen, og Ingrid Lunde har vært en meget god gruppe å tilhøre både faglig og sosialt. En stor takk til hver og en av dere.

Jeg vil også takke alle bioingeniørene på SAFE for hyggelig tilværelse på denne seksjonen.

Mine venner og min familie har vært en grunn for å holde ut gjennom et krevende og lærerikt år og jeg setter virkelig pris på dem alle sammen og takker dem fra bunnen av hjertet mitt for at de alltid har vært der for meg.

## Innhold

Forside .....	1
Forord .....	2
Innhold .....	3
Forkortelse .....	5
Sammendrag .....	7
1. Innledning .....	9
1.1 Organtransplantasjon .....	9
1.1.1 Levertransplantasjon .....	9
1.1.2 Avstøtning av transplantert organ .....	11
1.1.3 Hyperakutt avstøtning .....	12
1.1.4 Akutt avstøtning .....	12
1.1.5 Kronisk avstøtning .....	13
1.2 Immunsuppresiv behandling .....	13
1.2.1 Kortikosteroider .....	15
1.2.2 Kalsineurinhemmere .....	16
1.2.3 mTOR-hemmere .....	17
1.3 Mykofenolats virkemekanisme .....	18
1.3.1 Mykofenolats virkemekanisme .....	18
1.3.2 Mykofenolats farmakokinetikk .....	19
1.3.3 Interaksjoner .....	22
1.3.4 Mykofenolats bivirkninger .....	22
1.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering .....	23
1.4.1 Potensiell farmakodynamiskmonitorering .....	23
2. Hensikt .....	26
3. Materialer .....	28
3.1 Utstyr .....	28
3.2 Reagenser .....	30
4. Metode .....	34
4.1 Studiedesign .....	34
4.2 Analyse av purinbaser og IMPDH-aktivitet i CD4+ celler .....	35
4.2.1 Isolering av CD+ celler .....	35
4.2.2 Prøvebearbeidelse .....	35

4.3 Analyse av purinbaser ved hjelp av LC-MS/MS .....	37
4.4 Analyse av fri og total mykofenolat i plasma .....	40
4.5 Validering .....	40
4.5.1 Carry-over .....	40
4.5.2 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt .....	41
4.5.3 Linearitet for målt IMPDH-aktivitet .....	41
4.5.4 Impresisjon og nøyaktighet .....	42
4.6 Statistikk .....	42
5. Resultater .....	43
5.1 Metodevalidering .....	43
5.1.1 Impresisjon og nøyaktighet .....	43
5.1.2 Carry-over .....	45
5.1.3 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt .....	45
5.1.4 Korreksjon for xantinforekomst i IMP/NAD-løsning .....	46
5.1.5 Linearitet .....	46
5.2 Mykofenolats farmakokinetikk og farmakodynamikk hos levertransplanterte ...	47
5.2.1 Farmakokinetikk .....	47
5.2.2 Farmakodynamikk .....	50
5.2.3 Farmakodynamikk versus farmakokinetikk .....	57
6. Diskusjon .....	64
6.1 Validering av LC-MS/MS-metoden .....	64
6.1.1 Impresisjon og nøyaktighet .....	64
6.1.2 Carry-over .....	64
6.1.3 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt .....	64
6.1.4 Korreksjon for forekomst av xantin i IMP/NAD-løsning .....	65
6.1.5 Linearitet for målt IMPDH-aktivitet .....	65
6.2 Mykofenolats farmakokinetikk og farmakodynamikk .....	65
6.2.1 Farmakokinetikk .....	66
6.2.2 Farmakodynamikk .....	67
6.2.3 Farmakokinetiske-farmakodynamiske vurderinger .....	69
7. Konklusjon .....	72
8. Referanser .....	74

## Forkortelser

AcMPAG	- Mykofenolat-acylglukuronid
ADP	- Adenosin 5'-difosfat
ALAT	- Alanin aminotransferase
AP-1	- Aktivatorprotein-1
APC	- Antigen-presenterende celle
ASAT	- Aspartat aminotransferase
ATP	- Adenosin 5'-trifosfat
AUC	- Arealet under kurven
C3a	- Komplementfaktor C3a
C5a	- Komplementfaktor C5a
CMV	- Cytomegalovirus
CMV-IgG	- Cytomegalovirus immunoglobulin G
CNI	- Kalsineurininhibitor
COX-2	- Cyklooksygenase-2
cPLA	- Cytosolisk fosfolipase A
CRP	- C-reaktivt protein
CsA	- Ciklosporin A
DNA	- Deoksyribonukleinsyre
DPP IV	- Dipeptidyl peptidase-IV
DTH	- Forsinket type hypersensitivitet (delayed-type hypersensitivity)
EHC	- Enterohepatisk sirkulasjon
FKBP12	- FK-bindende protein-12
GDP	- Guanosin 5'-difosfat
GIT	- Gastrointestinal tractus
GR	- Glukokortikoid reseptor
GTP	- Guanosin 5'-trifosfat
HDL	- High density lipoprotein
HLA	- Humant leukocyt antigen
HPLC	- væskechromatografi (high-performance liquid chromatography)
HSP	- Heat shock protein
ICAM-1	- Intercellulært adhesjonsmolekyl-1 (inter-cellular adhesion molecule-1)

IFN- $\gamma$	- interferon- $\gamma$
IL	- Interleukin
IMP	- Inosin 5'-monofosfat
IMPDH	- Inosin 5'-monofosfat-dehydrogenase
INR	- Internasjonalt normalisert ratio
LC-MS/MS	- væskekromatografi koplet til tandem massespektrometri
LDL	- Low density lipoprotein
LT	- Leukotrien
MCP-1	- Monocytt kjemotaktisk protein-1 (monocyte chemotactic protein-1)
MMF	- Mykofenolat mofetil
MPA	- Mykofenolsyre (eller mykofenolat)
MPAG	- Mykofenolat-glukuronid
MRP2	- Multidrug-resistance-associated protein-2
mTOR	- mammalian target of rapamycin
NFAT	- Nukleær faktor for aktiverte T-celler
NF- $\kappa$ B	- Nukleær faktor-kappa B
PBMC	- Mononukleære celler i perifert blod (Peripheral blood mononuclear cells)
PRA	- Panel-reaktive antistoffer
RNA	- Ribonukleinsyre
SNP	- Singel nukleotid polymorfisme
TCR	- T-celle reseptor
TDM	- Terapeutisk legemiddelmonitorering (therapeutic drug monitoring)
TG	- Triglyserider
TH1	- T-hjelpercelle 1
TNF- $\alpha$	- Tumornekrosefaktor
UGT	- Uridindifosfat-glukuronosyltransferase
UV	- Ultrafiolett (lys)
XMP	- Xantin 5'-monofosfat

## Sammendrag

Etter organtransplantasjon brukes flere immunsuppressive legemidler sammen for å hindre avstøtning av transplantatet. Disse legemidlene har relativt smale terapeutiske vinduer hvor høye konsentrasjoner er assosiert med bivirkninger og toksisitet, mens lave konsentrasjoner er assosiert med terapiavvik og avstøtningsepisoder. Monitoreringen i dag er farmakokinetisk hvor blodkonsentrasjoner måles og et referanseområde tilstrebes.

Mykofenolat er en reversibel, non-kompetitiv hemmer av inosin 5'-monofosfat dehydrogenase (IMPDH) som er et viktig enzym i *de novo* biosyntesen av guanin- og deoksyguanin-nukleotider. Hemningen av IMPDH demper proliferasjonen av aktiverte B- og T-celler. Mykofenolat gis i dag ofte som standardisert dose tross stor variasjon innen- og mellom pasienter. Det er ønskelig å individualisere doseringen av mykofenolat for å optimalisere immunsuppresjonen. Biomarkører som beskriver mykofenolats molekylære farmakodynamikk, kan øke kunnskapsnivået om legemidlets virkemekanisme og bidra til utvikling av potensiell farmakodynamisk monitorering. Dette delprosjektet hadde hensikten å validere en LC-MS/MS-analysemetode for målinger av purinbaser i lymfocytter, og videre å studere purinbaser som mulige biomarkører hos levertransplanterte som bruker mykofenolat.

Tjue levertransplanterte pasienter ble inkludert i studien, hvorav 16 pasienter var med i hele studiens lengde. Blodprøver ble samlet 0-4 timer etter inntak av mykofenolat mofetil dose ved median dag 4 og dag 17 etter transplantasjon. Plasmakonsentrasjonen av total og fri mykofenolat ble kvantifisert ved hjelp av HPLC med UV-deteksjon. CD<sup>+</sup> celler ble isolert og purinbasene xantin, hypoxantin, guanin og adenin ble kvantifisert ved hjelp av LC-MS/MS. Xantin ble brukt til å beregne aktiviteten av IMPDH etter inkubering med enzymets substrat og kofaktor. Nivåene av purinbasene og IMPDH ble sammenlignet mellom dag 4 og dag 17 for å bestemme eventuelle endringer i tidlig fase etter levertransplantasjon, siden det er i denne perioden avstøtninger er mest frekvente. Farmakokinetiske-farmakodynamiske sammenhenger ble undersøkt.

Konsentrasjoner av purinbasene ble målt med variasjonskoeffisient mindre enn 15 % og nøyaktighet innenfor 85-115 % som var forhåndsdefinerte krav. Internstandardenes korleksjon for matrikseffekt og linearitet for målt IMPDH-aktivitet ble ansett å være

akseptable. Variasjonskoeffisienten for IMPDH-aktivitet mellom serier var noe høy (22 %), men likevel i tråd med tidligere rapportert impresisjon for slike målinger.

Plasmakonsentrasjonen av mykofenolat var høyest en time etter inntatt dose av mykofenolat mofetil ved begge dagene. Total mykofenolat og fri mykofenolat konsentrasjoner hadde verken signifikant økning eller nedgang fra dag 4 til dag 17, noe som betyr at farmakokinetikken var forholdsvis stabil. IMPDH-aktiviteten endret seg gjennom 4-timers intervallet hvor enzymaktiviteten var lavest ved 1 time etter dosering. Dette viser at IMPDH-aktiviteten responderer raskt på mykofenolatkonsentrasjonen. IMPDH-aktiviteten var ikke statistisk forskjellig ved dag 4 og dag 17.

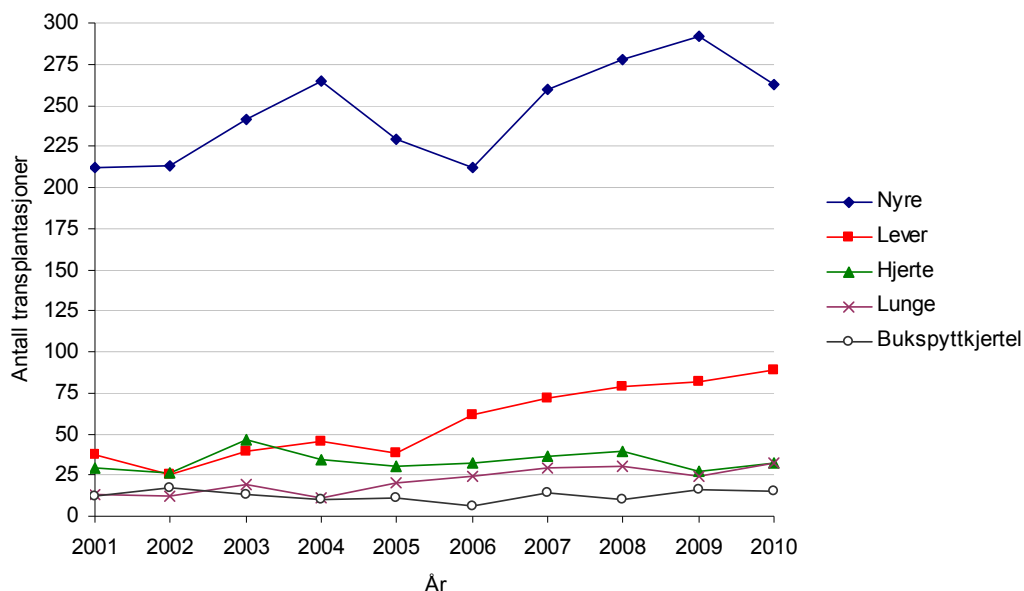
Nivået av guanin og guanin/hypoxantin-ratio var signifikant ( $P < 0,05$ ) lavere ved dag 17 sammenlignet med dag 4. Det var ingen systematisk endring av guanin-nivået i løpet av 0-4 timer etter dosering. Likevel ble det observert en signifikant korrelasjon mellom guanin og IMPDH på hver av de to studiedagene. Resultatene indikerer at guanin og guanin/hypoxantin-ratio responderer mer langsiktig på mykofenolat, og at de demed kan være aktuelle biomarkører for å beskrive den immunsuppressive effekten av mykofenolat i et lengre tidsperspektiv (dager/uker) i tidlig fase etter levertransplantasjon. Funnene er hypotesegenererende, slik at fremtidige studier må avdekke sammenhengen mellom disse mulige biomarkørene og mykofenolats kliniske effekt.



# 1. Innledning

## 1.1 Organtransplantasjon

Organtransplantasjoner mellom individer utføres ved akutt eller kronisk organsvikt eller når alvorlig organskade forekommer. Nyre, lever, hjerte, lunge og bukspyttkjertel er organer som transplanteres, og i tillegg kan også stamceller (beinmarg) overføres fra et individ til et annet for å behandle maligne tilstander. I Norge foregår all transplantasjonsvirksomhet ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Nyre er det organet som transplanteres hyppigst i Norge, dernest kommer lever og hjerte (1). Ved Rikshospitalet ble det i løpet av 2010 transplantert 263 nyrer (180 fra død og 83 fra levende donor), 89 lever, 32 hjerter, 32 lunger og 15 bukspyttkjertler (1). En oversikt over antall organtransplantasjoner i Norge i perioden 2001-2010 er vist i figur 1.



Figur 1. Antall organtransplantasjoner utført fra 2001 til 2010 i Norge, fordelt på organtype. Data hentet fra Årsrapport for organdonasjon og transplantasjon 1.januar – 31.desember 2010, Oslo universitetssykehus.

### 1.1.1 Levertransplantasjon

Første forsøk på levertransplantasjon var i 1963 i USA hvor pasienten var et 3 år gammelt barn som døde på operasjonsbordet. Flere forsøk ble utført gjennom 1960- og 1970-årene uten å lykkes. I Norge ble første operasjon utført i 1970-årene på Ullevål sykehus, men resultatet var nedslående. På begynnelsen av 1980-årene gikk levertransplantasjon fra å være en eksperimentell behandling til å bli et etablert behandlingstilbud ved irreversibel akutt og

kronisk leversvikt. Den forbedrede overlevelsen etter levertransplantasjon kan til dels skyldes at ciklosporin A ble tatt i bruk som et potent immunsuppressiv. Den 25. februar 1984 ble den første ikke-eksperimentelle levertransplantasjonen i Norge gjennomført ved Rikshospitalet. Siden den gang er det utført over 800 levertransplantasjoner ved sykehuset.

Til levertransplantasjon benyttes nesten utelukkende avdøde donorer. Hyppigste dødsårsak er hjerneblødning (ca. 50 % av donorene), mens 10 % av donorene er døde i trafikkulykker. Ventetiden på levertransplantasjon i Norge har blitt kortere gjennom årene, og en markant nedgang i ventetiden kom etter 2007 fordi det da ble innført splittlevertransplantasjon. I slike operasjoner gis venstre leverlapp til et barn mens høyre leverlapp gis til en liten voksen eller et stort barn. I dag er ventetiden ca. tre uker (2).

Litt over halvparten av de levertransplanterte er menn (ca. 53 %). Den hyppigste årsaken til transplantasjon hos disse er primær skleroserende kolangitt. Hos yngre kvinner er også primær skleroserende kolangitt vanlig årsak, mens primær biliær cirrhose tiltar som diagnose ved økende alder. Hos begge kjønn øker forekomsten av alkoholisk leversvikt med alderen (2). Eksempler på kroniske tilstander som kan føre til leverskade/svikt er:

- Hepatitt (autoimmun, viral eller legemiddelindusert)
- Alkoholisk cirrhose
- Kolestatiske sykdommer (bl.a. primær skleroserende kolangitt)
- Vaskulære sykdommer
- Metabolske sykdommer
- Malignitet

Akutt leversvikt er årsak til ca. 10 % av levertransplantasjonene hos voksne (2). Tilstander som kan gi akutt leversvikt er:

- Toksisk leverskade (legemidler, annet)
- Viral hepatitt (A, B, C, D, Herpes)
- Autoimmun hepatitt
- Budd-Chiari syndrom
- Akutt fettlever (graviditet)
- Wilson sykdom

Etter transplantasjon ligger voksne pasienter normalt på intensivavdelingen i inntil ett døgn før de flyttes til transplantasjonskirurgisk sengepost hvor de ligger i inntil 2 uker. Deretter overflyttes de til seksjon for fordøyelsessykdommer hvor videre behandling bestemmes og utskrivning vurderes. Små barn ligger på barneintensiv avdelingen noen dager før overflytting til barneklubben for videre oppfølging. Medisinsk-biokjemiske markører brukes for å vurdere levertransplantatets funksjon: laktat (stoffskeifefunksjon), alanin aminotransferase og aspartat aminotransferase (ALAT og ASAT: celledskade), INR og albumin (syntesefunksjon), total/konjugert bilirubin (gallestoffskifte, kolestase) (3). I Norge er ett års og fem års pasientoverlevelse for levertransplanterte henholdsvis ca. 90 % og 83 % (2).

### **1.1.2 Avstøtning av transplantert organ**

Organtransplantasjon mellom genetisk ulike individer kalles allogene transplantasjoner. Hos levertransplanterte skal blodtypen i utgangspunktet være identisk mellom donor og resipient, men i enkelte situasjoner aksepteres en donor med O-type til en A-type resipient. Det blir vanligvis ikke tatt hensyn til forlikelighet mellom humane leukocyt antigener (HLA). Negativ T-celle *crossmatch* testet i ferskt serum, er ønskelig (3).

Etter en allogen transplantasjon vil resipientens immunforsvar i varierende grad gå til angrep på det transplanterte organet (graftet). Avstøtning av organer kategoriseres i forhold til tid etter transplantasjon og avstøtningsprosessens forløp: hyperakutt, akutt eller kronisk. En avstøtningsepisode kan ofte behandles medikamentelt og vil ikke nødvendigvis føre til tap av transplantatet (4).

Immunologiske gjenkjennelsesmekanismer som kan føre til avstøtning, deles inn i tre forskjellige mekanismer:

- a) Direkte gjenkjennelse foregår ved at donorens antigenpresenterende celler (dAPC) presenterer proteinfragmenter som stammer fra donoren, direkte til resipientens effektorceller. Effektorcellene reagerer da med å skille ut cytokiner og starter en immunreaksjon mot transplantatet (5).
- b) Indirekte gjenkjennelse foregår ved at dAPC gjennomgår apoptose eller nekrose som fører til frisetting av cellefragmenter. Disse fragmentene tas opp av resipientens (r)APC og prosesseres. Deretter presenteres de på celleoverflaten ved hjelp av HLA-reseptorer.

Lymfocytter som gjenkjenner de fremmede fragment/HLA-kompleksene, aktiveres og en immunreaksjon startes (5).

c) Semi-direkte gjenkjennelse foregår ved at rAPC får HLA-reseptorene fra dAPC via endosomer som fusjoneres til membranen på rAPC. En tilleggsmekanisme er at dAPC begår apoptose eller nekrose, og da tar rAPC opp fragmenter av dAPC og prosesserer dem. Nå kan rAPC presentere dAPC fragmentene videre til effektorcellene (5).

### **1.1.3 Hyperakutt avstøtning**

ABO-antigener er uttrykt på overflaten av endotelceller i blodkar. Dersom det transplanterte organet er uforlikelig med hensyn til ABO vil resipienten normalt avstøte organet umiddelbart. En slik hyperakutt avstøtning skjer i løpet av noen minutter til få timer. Avstøtningen inntreffer fordi resipientens allerede eksisterende antistoffer vil angripe fremmede ABO-antigener. Dette utløser en immunkompleks-rekruttering som fører til inflammasjon som okkluderer blodkarene og ergo dør transplantatet. HLA klasse I finnes på overflaten av vaskulært endotel, så ved HLA-uforlikelighet vil resipientens antistoffer mot disse molekylerne kunne angripe og potensielt utløse en hyperakutt reaksjon (4).

Inflammasjonen ved hyperakutt avstøtning følger forløpet til en hypersensitivitetsreaksjon type III som involverer komplementsystemet. Fritt sirkulerende proteiner som tilhører komplementsystemet, vil kunne gjenkjenne antigener i transplantatet og dermed starte en inflammasjon samtidig som de samarbeider med andre molekyler og proteiner i komplementsystemet. Faktorene C3a og C5a vil utøve sine oppgaver som rekrutteringsmolekyler, og inflammasjonen videre vil inkludere leukocytrekruttering og frisetting av histamin som fører til videre inflammasjon og ødeleggelse av transplantatet (4).

### **1.1.4 Akutt avstøtning**

En akutt avstøtning inntreffer oftest dager til uker etter en allogen transplantasjon. Her er det T-celler som gjenkjenner og responderer på HLA-forskjellen mellom donor og resipient. De CD4<sup>+</sup> T-cellene responderer på HLA klasse II molekylerne, mens de CD8<sup>+</sup> T-cellene responderer på HLA klasse I molekylerne. T-cellene vil igangsette en immunreaksjon mot transplantatet og ødelegge det, men denne avstøtningen kan stoppes eller bremses ved bruk av immunsuppressive medisiner. Den akutte avstøtningen følger forløpet til en hypersensitivitetsreaksjon type IV som også kalles "delayed-type hypersensitivity reaction".

Denne reaksjonen er 100-1000 ganger sterkere enn den antistoffmedierte hypersensitivitetsreaksjonen, og dermed kan den ødelegge transplantatet relativt fort (4).

Pasientens allmenntilstand vil også påvirkes i stor grad på grunn av den kraftige inflammasjonen som utløses. APC presenterer antigenet til T-hjelperceller og effektorceller som frisetter cytokiner, kjemokiner og cytotoksiner som interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), leukotriener (LT) og interleukiner (IL). Disse frisatte mediatorene er inflammatoriske, og dermed rekrutterer de enda flere T-celler, fagocytter og proteiner som forsterker immunresponsen og avstøtningsprosessen (4).

Hos levertransplanterte kan en akutt avstøtning diagnostiseres ved markert stigning i ALAT/ASAT eller langsom stigning i bilirubin. Senere tegn er temperaturstigning og smerte over transplantatet. Avstøtningsdiagnosen verifiseres ved leverbiopsi før eventuell medikamentell behandling startes (3).

### **1.1.5 Kronisk avstøtning**

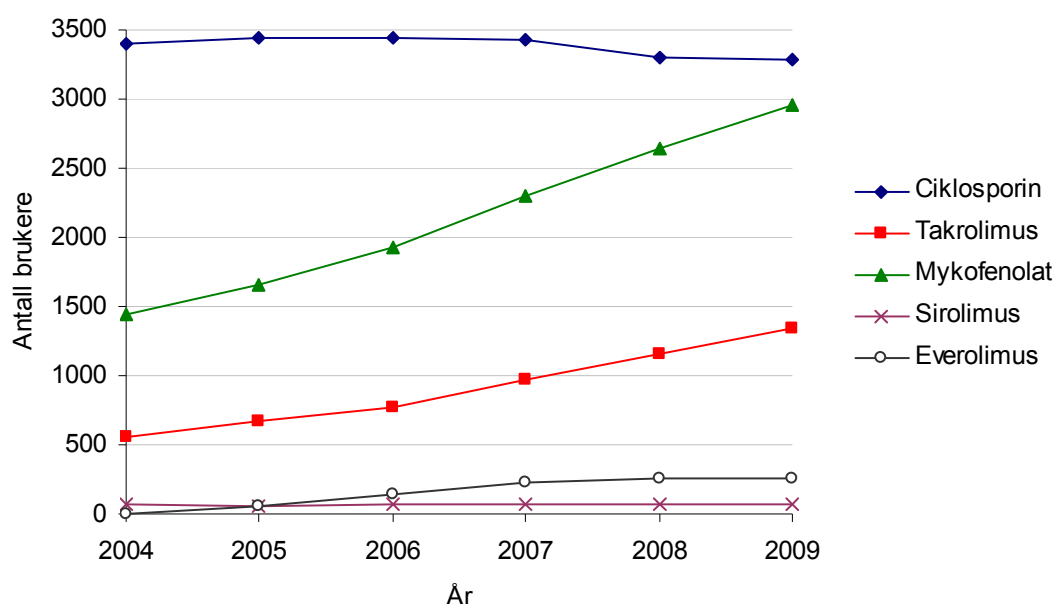
Kronisk avstøtning har et forløp på måneder til år. Blodåreveggene i transplantatet fortykkes og dermed blir indre diameter mindre. Dette medfører nedsatt perfusjon. Som følge kan iskemier og nedsatt organfunksjon forekomme (4). Prosessen for kronisk avstøtning begynner med at CD4<sup>+</sup> T-hjelperceller gjenkjenner spesifikke antigener fra transplantatet. Gjenkjennelsen er indirekte ved at dendritiske celler fra donoren vandrer til lymfen hos resipienten og begår apoptose. Membranfragmenter som inneholder donors HLA-molekyler, blir tatt opp og prosessert av rAPC. Videre presenteres fragmentene på rAPCs overflate ved hjelp av HLA klasse II. Resipientens T-celler vil gjenkjenne disse antigen/HLA-kompleksene og i sin tur stimulere B-celler. Dette setter i gang en immunreaksjon mot transplantatet, noe som i stor grad rammer blodåreveggene og medfører vaskulær forsnevring og nedsatt organfunksjon (4).

## **1.2 Immunsuppressiv behandling**

Etter en allogen transplantasjon brukes kombinasjoner av immunsuppressive legemidler for å hindre at kroppen avstøter det transplanterte organet. I dag består kombinasjonen som regel av tre medisiner; en kalsineurinhemmer (CNI: ciklosporin eller takrolimus), et glukokortikoid (innledningsvis metylprednisolon, deretter prednisolon), og mykofenolat. Mykofenolat har nå i stor grad erstattet antimetabolitten azatioprin i forbindelse med avstøtningsprofylakse. I

enkelte pasientpopulasjoner brukes også antistoff mot IL-2-reseptoren i tidlig fase etter transplantasjon. Sirolimus og everolimus er hemmere av *mechanistic target of rapamycin (mTOR)*, og de kan enten brukes sammen med CNI, eller de kan erstatte CNI i de tilfellene disse legemidlene ikke er egnet for pasienten (3,6).

Ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet finnes behandlingsprotokoller som spesifiserer den immunsuppressive behandlingen i forhold til kliniske faktorer og type organtransplantasjon. I figur 2 vises en oversikt over antall brukere av immunsuppressive legemidler med avstøtningsprofylakse etter organtransplantasjon som primærindikasjon.



Figur 2. Antall brukere av ulike immunsuppressive legemidler i Norge. Legemidlene har avstøtningsprofylakse etter organtransplantasjon som primærindikasjon, men de brukes også av andre pasientgrupper (f. eks. til behandling av autoimmune sykdommer som revmatoid artritt og psoriasis). Tallmaterialet er hentet fra Reseptregisteret, Nasjonalt folkehelseinstitutt ([www.reseptregisteret.no](http://www.reseptregisteret.no)).

Hos levertransplanterte er det vanlig å bruke trippelbehandling som inkluderer takrolimus, steroider og mykofenolat. Alternativet er å bruke ciklosporin A, steroider og mykofenolat. Eldre pasienter (>65 år) og pasienter med nedsatt nyrefunksjon venter med oppstart av CNI inntil dag 4 postoperativt, og de får induksjonsbehandling med IL-2-reseptorantagonisten basiliximab. Standard immunsuppressiv behandling for voksne levertransplanterte pasienter

med normal nyrefunksjon innledes med høydose metylprednisolon peroperativt. Etter operasjonen brukes prednisolon 80 mg to ganger daglig. I løpet av et halvt til ett år trappes prednisolondosen ned til 5 mg. Etter ett år vurderes det om prednisolon kan seponeres. Behandlingen med takrolimus og mykofenolat startes dag 1 postoperativt. Den første måneden skal predose blodkonsentrasjonen av takrolimus være 5-15 µg/L, så 5-10 µg/L i fem måneder, og videre tilstreber man 5-8 µg/L i seks måneder. Etter ett år er det terapeutiske vedlikeholdsområdet 3-8 µg/L. Predose plasmakonsentrasjonen av mykofenolat bør være 3-5 mg/L. Førstelinje rejeksjonsbehandling er høydose metylprednisolon. Ved manglende respons gis antitymocyttglobulin. Dersom dette ikke fører frem brukes antistoff mot CD3-reseptoren (muromonab) som tredje linje behandling av rejeksjon (3).

### **Standard induksjons- og vedlikeholdsbehandling VOKSNE**

DAG	Solu-medrol® iv Prednisolon® po	Advagraf® (kons.)	Cellcept® (kons.)
Under operasjon	40 mg iv ved start 500 mg iv før reperf. 40 mg postop.		
1	80 mg	0,1 mg/kg po	1 g x 2
2	80 mg	(5-15 µ g/l)	(3-5 µg/l)
3	70 mg		
4	60 mg		
5	50 mg		
6	40 mg		
7	30 mg		
8-30	20 mg		
31-60	15 mg	(5-10 µ g/l)	
61-90	10 mg	(5-10 µ g/l)	
91-180	7.5 mg	(5-10 µ g/l)	
181-360	5 mg	(5-8 µ g/l)	
>360	→ 0 (tapering)*, **	(3-8 µ g/l)	0,5 g x 2

\* Ikke ved autoimmun leverlidelse.

\*\* Se 5.1.6 for HCV infeksjon

Figur 3. Oversikt over induksjons- og vedlikeholdsbehandling med immunsuppresiva gjennom det første året etter levertransplantasjon. Figuren hentet fra Protokoll for levertransplantasjon 2009.

(Figur: Trykket med tillatelse fra Pål-Dag Line)

#### **1.2.1 Kortikosteroider**

Metylprednisolon og prednisolon er syntetiske glukokortikoider som virker antiinflammatorisk og immunsuppressivt. De binder seg til *heat shock protein* (HSP) proteinkomplekset i cytosol og translokeres deretter til kjernen hvor de regulerer genuttrykket av cytokiner og andre inflammatoriske mediatorer (figur 4). Glukokortikoidene nedregulerer

transkripsjonen av proinflammatoriske mediatorer som nukleær faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) og aktivator protein 1 (AP-1). Denne mekanismen medfører videre nedgang i transkripsjonen av inflammatoriske cytokiner som interleukiner (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12) og interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), kjemokiner som monocytt kjemotaktisk protein 1 (MCP-1), IL-8 og eotaksin, samt adhesjonsmolekyler som E-selektin og intercellulært adhesjonsmolekyl 1 (ICAM-1) og det inflammatoriske enzymet cyklooksygenase-2 (COX-2) (7).

Glukokortikoidene utøver i tillegg ikke-genomiske effekter relatert til direkte påvirkning av proteiner og endring av cellenes membranegenskaper. Frigjøring av annexin-1 stimuleres av glukokortikoider. Dette hemmer aktivering av cytosolisk fosfolipase A (cPLA) og inflammasjonsprosessen dempes. Andre ikke-genomiske effekter har sammenheng med at glukokortikoider påvirker cellemembranens fysiokjemiske egenskaper, noe som kan påvirke aktiviteten av membran-assosierte proteiner (7).

Bivirkningene av glukokortikoidene minner om symptomer som sees hos personer med Cushings syndrom. Disse bivirkningene er i form av forstyrret fettavleiring i kroppen, der fettet samles i abdomenregionen og i ansiktet (måneansikt). Andre vanlige bivirkninger er tendens til magesår, diabetes, osteoporose, tynn og skjør hud og dårligere sårtilheling, hypertensjon, samt psykiske forstyrrelser som depresjon og psykoser (7-10).

### 1.2.2 Kalsineurinhemmere

Ciklosporin og takrolimus er hemmere av fosfatasen kalsineurin, og disse legemidlene virker immunsuppressivt ved å inhibere aktiveringen av T-celler. Ciklosporin binder seg til det intracellulære proteinet ciklofilin, og dette komplekset hemmer kalsineurins fosfataseaktivitet overfor transkripsjonsfaktoren *nuclear factor of activated T cells* (NFAT). Resultatet er nedsatt transkripsjon og dermed redusert syntese av IL-2, noe som demper den videre aktiveringen av T-cellerne (figur 4). Takrolimus binder seg til FK-bindende protein-12 (FKBP-12) i cytosol. Dette legemiddel/protein-komplekset hemmer kalsineurin etter samme prinsipp som ciklosporin/ciklofilin (figur 4) (11).

Hos levertransplanterte er takrolimus generelt førstevalget fremfor ciklosporin. Takrolimus antas å være mindre nyretoksisk, men ciklosporin gis til pasientene som er kontraindisert takrolimus eller har andre oppveidende grunner (6). Haddad *et al.* rapporterer at takrolimus gav bedre transplantat- og pasientoverlevelse sammenlignet med ciklosporin i sitt store datamateriale. Ved sammenligning av bivirkningsprofilene var takrolimus og ciklosporin



forholdsvis like med unntak av at det var høyere forekomst av diabetes hos pasientene som brukte takrolimus (12). De vanligste bivirkningene av takrolimus er doseavhengige og reversible. Økt fare for infeksjoner skyldes den immundempende effekten av det medikamentelle regimet. Diaré, kvalme og hodepine er blant de hyppigst forekommende bivirkninger, men de er ufarlige. Mer alvorlige bivirkninger som også er vanlige er nyretoksisitet, levertoksisitet, hypertensjon og diabetes mellitus (6,7,13).

Takrolimus (eller ciklosporin) gis i høyere doser den første perioden etter transplantasjon og dosen trappes ned det første året til en vedlikeholdsdose. En optimal dosering som bygger på blodkonsentrasjonsmålinger, gir immunsuppresjon som hindrer avstøtning og samtidig lav forekomst og grad av bivirkninger (3).

### **1.2.3 mTOR-hemmere**

*Mammalian target of rapamycin* (mTOR)-hemmerne sirolimus og everolimus virker ved å binde seg til proteinet FKBP-12, og dette komplekset hemmer kinaseaktiviteten til mTOR kompleks 1 (figur 4). mTOR kompleks 1 har viktige funksjoner i forbindelse med regulering av celleproliferasjon, deriblant aktivering av p70 S6 kinase som formidler signal om økt proteinsyntese. Ved aktivering av T-celler er mTOR involvert i både IL-2-reseptoravhengige og CD28-avhengige signalveier. Hemmingen av mTOR fører til stans i cellyklus mellom G1- og S-fasen. mTOR-hemmerne bremser dermed vekst og proliferasjon av aktiverte lymfocytter (14).

Hos nyretransplanterte er det vist at mTOR-hemmere ikke gir like god profylakse mot avstøtningsepisoder som CNI (15). Men sammenlignet med CNI vil mTOR-hemmere være mer skånsomme mot nyrene og dermed bidra til å opprettholde nyrefunksjonen (16). Bruk av mTOR-hemmere medfører bivirkninger som hyperlipidemi; økning i både "high density" og "low density" lipoproteiner (HDL, LDL) og triglyserider. Trombocytopeni, anemi og leukopeni synes mest frekvent ved oppstart, men avtar etter hvert. Svekket sårtilheling forekommer også som vanlig bivirkning av mTOR-hemmere (14,17).

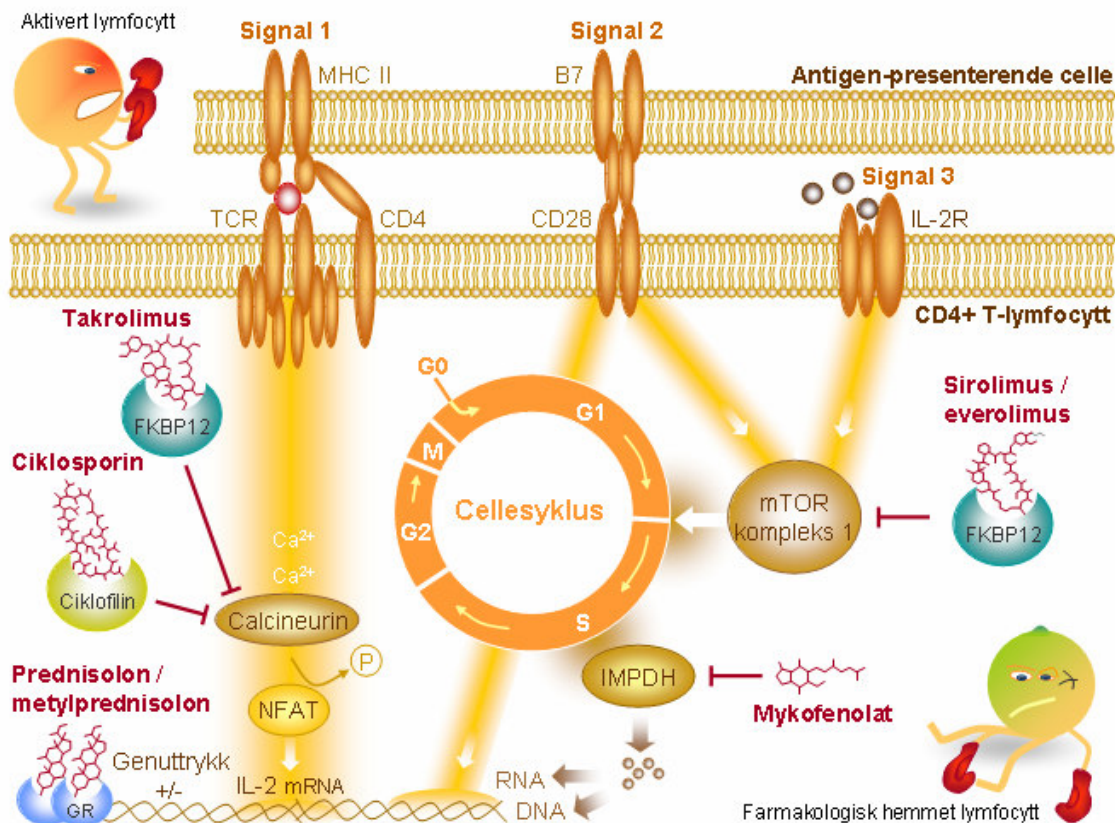
Også mTOR-hemmere gis i høyere doser den første perioden etter transplantasjon og dosen trappes deretter ned. Bruk av sirolimus og everolimus krever individuell dosetilpassing slik at blodkonsentrasjonene holdes innenfor spesifiserte terapeutiske områder (ofte innenfor 5-15 µg/L) (3,6).

## 1.3 Mykofenolat

### 1.3.1 Mykofenolats virkemekanisme

Mykofenolat er en reversibel, non-kompetitiv hemmer av enzymet inosin 5'-monofosfat dehydrogenase (IMPDH)(18). Human IMPDH finnes som to isoenzymer, IMPDH 1 og IMPDH 2. Disse isoenzymene er 84 % identiske i aminosyresekvensene og de er uttrykt i de fleste vev (19). I ikke-aktiverte mononukleære celler i perifert blod (PBMC) er IMPDH 1 uttrykt i større grad enn IMPDH 2 (20). I sirkulerende CD4<sup>+</sup> celler er uttrykket av de to isoenzymene ikke markant forskjellig (21). Ved aktivering av lymfocytter oppreguleres uttrykket av både IMPDH 1 og 2, og følgende vil cellenes totale IMPDH-aktivitet øke (20). IMPDH katalyserer oksideringen av inosin 5'-monofosfat (IMP) til xantosin 5'-monofosfat (XMP). Dette er det hastighetsbestemmende trinnet i *de novo* biosyntesen av guanin- og deoksyguanin-nukleotider som er viktige byggesteiner i henholdsvis RNA og DNA (22).

Den immunsuppressive effekten av mykofenolat henger sammen med hemmet proliferasjon av B- og T-celler. Selektiviteten av dette legemidlet kommer av at aktiverte B-og T-celler i høy grad er avhengige av nysyntese av guanin og deoksyguanin, mens andre celletyper i større grad kan benytte seg av alternative synteseveier (22). Mykofenolats virkemekanisme er illustrert i figur 4.



Figur 4. Virkningsmekanismer for immundempende legemidler. Tre signalveier fra overflatereseptorer sørger for immunaktiveringen av en CD4+ T-lymfocyt. Antigen fra transplantatet gjenkjennes av T-celle-reseptoren (TCR) som via kalsineurin signaliserer økt produksjon av interleukin-2 (IL-2).

Takrolimus binder seg til FK-bindende protein-12 (FKBP-12) og ciklosporin binder seg til proteinet ciklofilin. Disse legemiddel/protein-kompleksene hemmer fosfatasen kalsineurin. Signaler fra CD28 og IL-2-reseptoren på celleoverflaten stimulerer blant annet mTOR kompleks 1 som videre regulerer økt proteinproduksjon. Dermed kan proliferasjon tillates, og cellen går fra G1- til syntese (S)-fase i cellesyklus. Sirolimus og everolimus binder seg også til FKBP-12, men disse legemidlene hemmer mTORs kinaseaktivitet. IMP dehydrogenase (IMPDH) er sentral i syntesen av purinbaser som skal inngå i DNA og RNA. Dette enzymet hemmes av mykofenolat. Glukokortikoidene prednisolon og metylprednisolon binder seg til den intracellulære glukokortikoidreseptoren (GR).

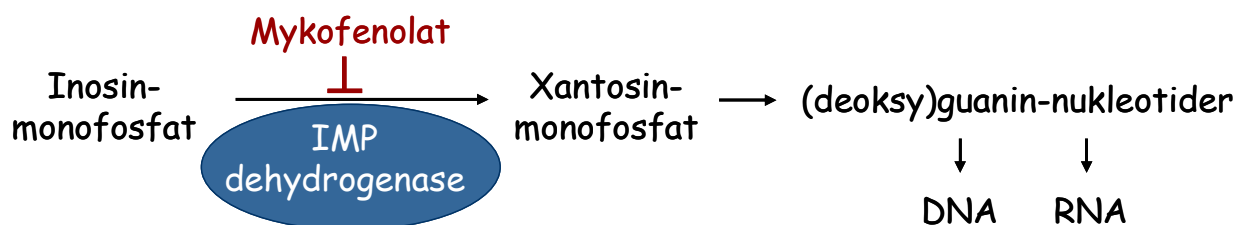
Glukokortikoidkompleksene regulerer uttrykket av flere immunrelaterte gener.

(Figur: Nils Tore Vethe)

### 1.3.2 Mykofenolats farmakokinetikk

Mykofenolat finnes i to forskjellige formuleringer hvor den ene er mykofenolatmofetil (MMF; prodrug) og den andre er enterodrasjert mykofenolatnatrium. Begge gis oftest i standardiserte doser på henholdsvis 1000 mg eller 720 mg to ganger daglig. Etter peroral administrering hydrolyseres MMF av esteraser og tas hurtig opp i gastrointestinaltrakten

(GIT). Maksimal plasmakonsentrasjon av den aktive substansen mykofenolat oppnås 1-2 timer etter inntatt dose av MMF og biotilgjengeligheten er ca. 80-95 %. Mykofenolat bindes til albumin i plasma der proteinbindingsgraden er 97-99 %, men den kan være noe lavere tidlig etter transplantasjon i tilfeller hvor farmasøytisk albumin gis pasientene, siden denne inneholder konserveringsstoffer som fortrenger mykofenolat (23-25).

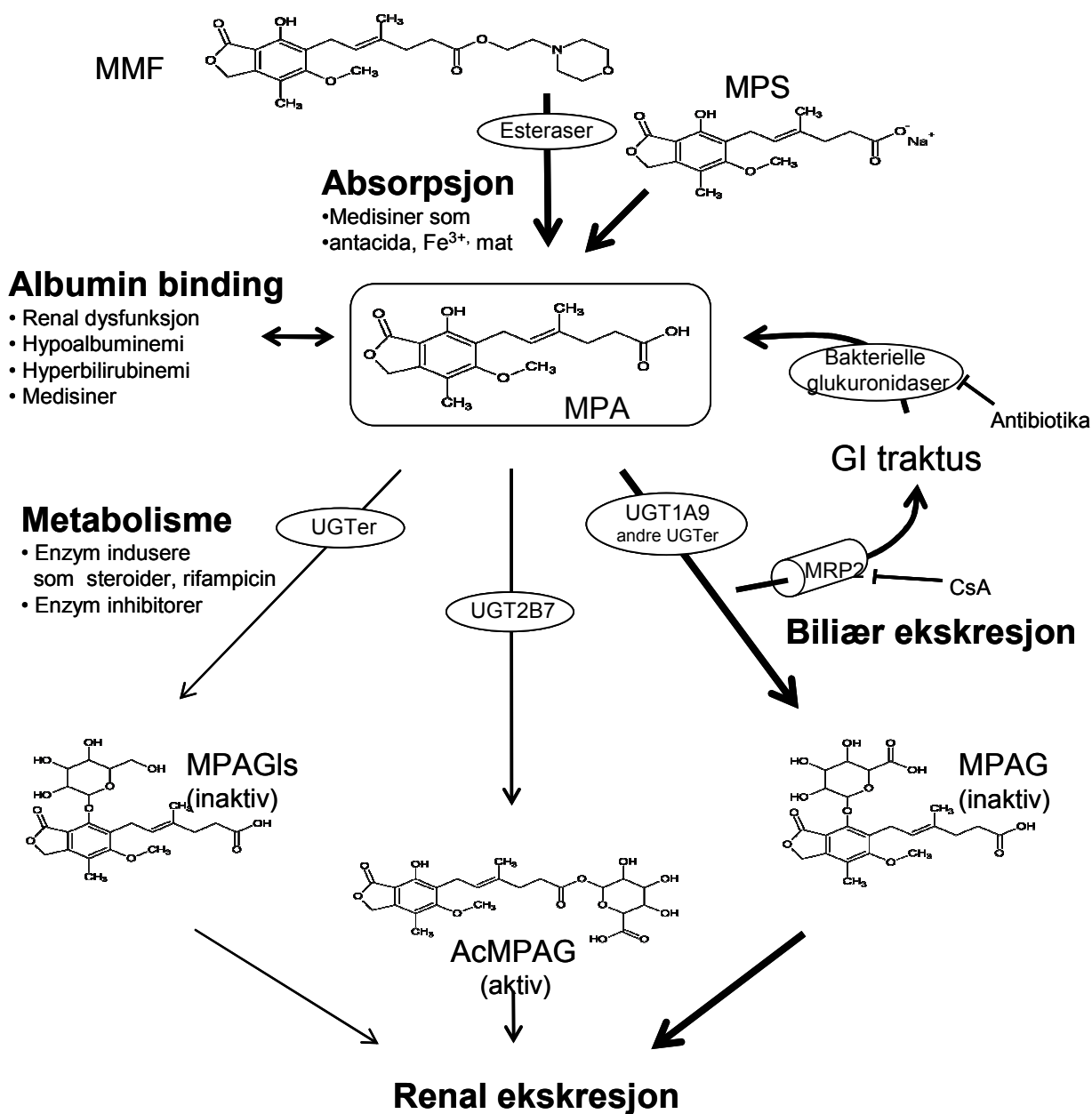


Figur 5. Virkemekanismen til Mykofenolat på detaljert nivå og hvordan det påvirker purinbasene.

Mykofenolat metaboliseres via uridindifosfat-glukuronosyltransferaser (UGT) i lever, tarm og nyrer (figur 6). Hovedmetabolitten er mykofenolat-7-O-glukuronid (MPAG) som er farmakologisk inaktiv. I hovedsak er det UGT 1A9 som står for metabolismen. UGT 2B7 metaboliserer mykofenolat til et acylglukuronid (AcMPAG) som foreligger i lav konsentrasjon og som sannsynligvis hemmer IMPDH i tilsvarende grad som mykofenolat (23,25). MPAG utskilles i stor grad via gallen til tarmen hvor metabolitten kan hydrolyseres til mykofenolat via bakterielle glukuronidaser. Videre kan mykofenolat reabsorberes. Dette kalles entero-hepatisk sirkulasjon og synes i form av en sekundær topp i mykofenolats konsentrasjon vs. tid-kurve. Sekundærtoppen inntreffer oftest 4-12 timer etter inntatt MMF-dose, og den utgjør ca. 40 % av den primære toppen (23,25).

Det er mange faktorer som fører til at mykofenolat utviser høy grad av farmakokinetisk variasjon mellom pasienter. Grad av absorpsjon og metabolisme vil variere mellom individer. Genetiske varianter i form av singel-nukleotid polymorfismer (SNP) i UGT 1A9 genet bidrar til den store variasjonen man ser mellom individer (23,26,27). Nedsatt nyrefunksjon fører til redusert utskillelse av metabolitten MPAG som konkurrer med mykofenolat om binding til albumin. Dette resulterer i at mykofenolat fortrenses fra albumin og fri fraksjon øker. Dette gjør en større andel av legemidlet tilgjengelig for metabolisme. Derfor vil redusert nyrefunksjon medføre økt eliminasjon (metabolisme) av mykofenolat. Doseinntak med eller uten mat påvirker ikke farmakokinetikken når pasienten har brukt medisinen en stund, men i startfasen kan samtidig matinntak redusere mykofenolats  $C_{maks}$  med ca. 40 %. Andre faktorer

som påvirker farmakokinetikken er interaksjoner med andre legemidler som nevnt ovenfor. Kjønn og etnisitet påvirker ikke farmakokinetikken signifikant (23).



Figur 6. Mykofenolat mofetil (MMF) aktiveres til mykofenolat (MPA) og metaboliseres til MPAG (Mykofenolat-7-O-glukuronid), AcMPAG (Mykofenolat-acylglukuronid) og MPAGI (Mykofenolat-glukosid).

(Figur: Trykket med tillatelse fra Sara Bremer)

Hos levertransplanterte har studier vist at mykofenolat AUC<sub>0-12t</sub> er lavere de første dagene etter transplantasjon sammenlignet med hva som er observert senere. Dette kan forklares med at absorpsjonen er lavere og eliminasjonen er høyere. Første periode etter transplantasjon kan

albuminnivået være lavt, og etter hvert som nivået stabiliseres vil også fri konsentrasjon av mykofenolat stabiliseres. Fri konsentrasjon av mykofenolat påvirkes av variasjon i albuminnivået siden proteinbindingsgraden er 97-99 % (28). Data fra levertransplanterte viser en relativt stor variasjon i total mykofenolat  $AUC_{0-12t}$  fra gjennomsnittet som er 33,5 mg·h/L (8,20-65,6). Variasjonen er også stor for fri mykofenolat  $AUC_{0-12}$  i forhold til gjennomsnittet som er 467 µg·h/L (55.1-1585) (29).

### 1.3.3 Interaksjoner

Ciklosporin reduserer den entero-hepatiske sirkulasjonen av MPAG/mykofenolat ved å hemme transportproteinet *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2) i hepatocytene (30). Hemmingen av MRP2 fører til 30-40 % lavere systemisk eksponering av mykofenolat (31,32). Antibiotika kan påvirke mengden glukuronidasebakterier i tarmen (normalflora) så de kan påvirke mykofenolat systemisk eksponeringen (33-35).

Protonpumpehemmere som lansoprazol og pantoprazol har vist i en studie at de reduserer biotilgjengligheten av mykofenolat med 30-40 %. Denne interaksjonen kan muligens skyldes redusert absorpsjon i forbindelse med at protonpumpehemmerne øker ventrikkelens pH-verdi (36). Antacida som aluminiumhydroksid eller magnesiumhydroksid kan også redusere systemisk mykofenolat fordi absorpsjonen i GIT reduseres på grunn av en antatt kompleksdannelse (37). Det er påvist redusert systemisk eksponering av mykofenolat ved samtidig inntak av rifampicin. Dette kan forklares med at rifampicin inducerer UGT slik at metabolismen av mykofenolat øker (38,39). Kasusrapporter har også vist at valproinsyre kan redusere den totale plasmakonsentrasjonen av mykofenolat (40). En mulig forklaring kan være fortrenging fra albumin og følgende økt mengde fritt mykofenolat som da blir gjort tilgjengelig for metabolisme.

### 1.3.4 Mykofenolats bivirkninger

Gastrointestinale bivirkninger som kvalme, oppkast og diaré er de mest vanlige hos pasienter som bruker mykofenolat. Disse bivirkningene er mer uttalt hos pasienter som bruker høye doser, men de reverseres etter nedtrapping av dose eller ved seponering. Andre GI-bivirkninger som bløende gastritt, perforert tykktarm, og pankreatitt er rapportert i sjeldne

tilfeller, og de kan være dødelige. På grunn av den immunsuppressive effekten av mykofenolat er det økt risiko for å få infeksjoner forårsaket av bakterier, sopp og virus (41).

Beinmargssuppresjon er sett i sammenheng med langvarig bruk av mykofenolat. Leukopeni, trombocytopeni og anemi er blitt rapportert der frekvensen var på 7-35 %. Anemi og leukopeni er oftest inntreffende av de hematologiske bivirkningene. Neutropeni forekommer derimot sjeldent. Disse bivirkningene synes ofte 30-180 dager etter transplantasjon og de reverseres ved seponering av mykofenolat. I noen studier er det indikert at mykofenolat øker forekomsten av cytomegalovirus-infeksjoner (CMV), men andre studier har konkludert med at økningen skyldes immunsuppresjonsregimet i sin helhet. Mykofenolat har ikke mutagene eller onkogene effekter, men har vist teratogenitet i dyremodeller og hos mennesker (41-43).

#### **1.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering**

Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM; *therapeutic drug monitoring*) innebærer at man justerer dosen hos den enkelte pasient basert på målinger av legemiddelet i blod eller plasma. Dette vil være aktuelt ved bruk av legemidler som har høy intra- og interindividuell farmakokinetisk variasjon, og der legemidlene samtidig har smale terapeutiske konsentrasjonsområder.

Hos nyretransplanterte har dosejustering basert på mykofenolats totale plasmakonsentrasjon i tidlig fase etter transplantasjon vist seg å være nyttig med tanke på å redusere risiko for avstøtning (44), men dette er ikke grundig studert hos levertransplanterte. Det er dokumentert at total mykofenolat  $AUC_{0-12t} < 30 \text{ mg} \times \text{t/L}$  øker risikoen for avstøtningsepisoder hos nyretransplanterte. Dette AUC-nivået korresponderer med en predose-konsentrasjon på ca. 1,0 mg/L (45). Ved hjelp av populasjonsbaserte algoritmer kan  $AUC_{0-12t}$  estimeres basert på tre konsentrasjonsmålinger i løpet av 0-3 timer etter inntak av MMF-dose. Fra en prospektiv studie er det rapportert at individualisert MMF-dosering basert på estimert  $AUC_{0-12t}$  (målsetning  $40 \text{ mg} \times \text{t/L}$ ) reduserte forekomsten av avstøtninger det første året etter nyretransplantasjon (23,28).

##### **1.4.1 Potensiell farmakodynamisk monitorering**

Det finnes flere studier hvor man har undersøkt biomarkører som potensielt kan brukes til farmakodynamisk monitorering av immundepende legemidler i

transplantasjonssammenheng. Ved monitorering av molekulære farmakodynamiske markører kvantifiserer man nivå eller aktivitet av molekyler som kan relateres til legemidlenes effekt hos den enkelte pasient. Dermed har man muligheten til å integrere både farmakokinetisk og farmakodynamisk variasjon. Noen markører er globale i den forstand at de kan brukes til å beskrive pasientens totale immunstatus (immunsuppresjon), mens andre markører tar sikte på spesifikt å beskrive effekten av et bestemt legemiddel(46).

Nivået av HLA-antistoff gir et estimat på B-celle-mediert humoral avstøtning, og denne markøren kan øke ved underimmunsuppresjon. Ved å måle HLA-antistoff er det mulig at man vil kunne forutsi risiko for antistoff-mediert avstøtning og om doseringen er optimal. CD30-molekylet tilhører TNF-familien og finnes på overflaten av T-celler. Ved aktivering av CD30+ T-celler frisettes en løselig form av CD30 (sCD30) i blodet. Lave nivåer av sCD30 er assosiert med høyere forekomst av infeksjoner, mens høye sCD30-nivåer er assosiert med økt risiko for avstøtning. Denne markøren kan derfor være et nyttig mål på pasientens immunstatus (46).

Adenosintrifosfat (ATP) er et viktig molekyl både som koenzym og som signaleringsmolekyl. Ved stimulering av CD4+ T-celler vil det intracellulære nivået av ATP (iATP) øke. Studier har vist at iATP er signifikant lavere hos de med økt infeksjonstendens, mens iATP var signifikant høyere hos de med avstøtningsepisoder. Det kan likevel være problematisk å skille pasienter med slike komplikasjoner fra pasienter med ukomplisert forløp når man legger iATP til grunn. Nivået av iATP vil i stor grad overlappe mellom disse pasientkategoriene (46).

Under akutte avstøtningsepisoder er det flere markører som kan være forhøyet. Slike markører kan være nyttige mål for å forutsi risiko og alvorlighetsgrad av avstøtninger. Cytokiner og overflatereseptorer på T-celler oppreguleres ved akutte avstøtningsepisoder. Blant disse cytokinene har IL-2 og TNF- $\alpha$  og overflatereseptorene CD25 og Cd71 blitt undersøkt. Markørene har blitt studert for å sammenligne forskjellige immunsuppresjonsregimer. Forhøyede nivåer av markørene ble sett hos undersupprimerte pasienter (46).

CD26 er overflateglykoprotein som virker kostimulatorisk hos T-celler. Forhøyet nivå av CD26 er sett i sammenheng med akutte avstøtningsepisoder siden TH1-celler er involvert. Sammenhengen mellom immunsuppressive legemidler og CD26-nivå har blitt studert *in vitro*,



og det ble sett en negativ korrelasjon mellom immunsuppressive legemidler og CD26-nivået. Bestemmelse av CD26/dipeptidylpeptidase IV (CD26/DPP IV), som gir et mål på T-celle aktivitet, kan utføres direkte i fullblod og dette gir praktiske fordeler ovenfor andre biomarkører (46).

IMPDH er blitt undersøkt tidligere som spesifikk biomarkør for mykofenolats effekt. IMPDH-aktivitet har vist stor variasjon mellom pasienter, (ca. 10 ganger forskjeller). Genetikk, pasienters immunstatus og medikamentell immunsuppresjon kan være årsaker til observerte forskjeller av IMPDH-aktiviteten. I en studie var lav IMPDH-aktivitet i forkant av nyretransplantasjon assosiert med reduserte MMF-doser, mens pasienter med høy IMPDH-aktivitet hadde hyppigere forekomst av avstøtninger. Plasmakonsentrasjoner av mykofenolat som ga 50 % hemning av IMPDH, var i området 1-5 mg/L (46). En annen studie av nyretransplanterte har vist en signifikant sammenheng mellom lav hemming av IMPDH den første uken etter transplantasjon og risiko for avstøtning (47).

Purinnukleotider har også blitt studert som spesifikke biomarkører for effekten av mykofenolat. Vethe *et al.* har undersøkt nivåene av guanosin difosfat (GDP), guanosin trifosfat (GTP) og ATP i dyrkede celler som ble eksponert for mykofenolat. Resultatene fra denne studien demonstrerte blant annet at økt mykofenolatkonsentrasjon førte til lavere nivåer av purinnukleotidene (48). I en *in vivo* studie blant friske frivillige viste Vethe *et al.* at det ikke var noen systematisk endring av purinnukleotidene GDP, ADP og AMP i CD4<sup>+</sup> celler etter inntak av fire forskjellige MMF-doser (100, 250, 500 og 1000 mg). Nivåene av GTP og ATP viste en tendens til økning (49). Disse *in vivo*-resultatene er ikke i samsvar med teorien om mykofenolats virkemekanisme siden hemming av IMPDH forventes å føre til lavere nivå av guanin-nukleotidene. Det er mulig at mykofenolats effekt på purinnukleotidene er mer langsiktig, slik at man ikke ser effekten ved å gjøre målinger kun i løpet av en dag eller innenfor ett enkelt doseintervall. For at man skal kunne trekke konklusjoner om hvordan mykofenolat påvirker purinnukleotidene er det nødvendig med flere studier hvor man undersøker nivåene av disse markørene i lymfocytter hos pasienter som bruker mykofenolat.

## 2. Hensikt

Mykofenolat inngår i den immunsuppressive behandlingen av levertransplanterte pasienter. Tidligere studier av mykofenolats farmakokinetikk og farmakodynamikk er hovedsakelig utført hos nyretransplanterte, og det er da vist at IMPDH hemmes kraftig innenfor hvert doseintervall (50). Formålet med å hemme IMPDH i lymfocytter er å redusere deres kapasitet til å produsere guanin- og deoksyguanin-nukleotider når en immunaktivering inntreffer. Da hemmer man lymfocyttenes RNA- og DNA-syntese, og proliferasjonen bremses. Foreløpig finnes kun begrenset kunnskap om hvordan (deoksy)guanin-nukleotider og andre purinnukleotider responderer på mykofenolat *in vivo*. Resultater fra friske frivillige tyder så langt på at det ikke er en rask nedgang av purin-nivåene like etter enkeltdoser av mykofenolat (49).

Nivåer av purinnukleotider i lymfocytter, og da spesielt guanin- og deoksyguanin-nukleotider, kan være aktuelle mål på mykofenolats molekylære effekt og dermed reflektere graden av dette legemidlets immunsuppresjon. Purinene kan potensielt gi et bedre og mer spesifikt mål på immunsuppresjon enn plasmakonsentrasjoner av mykofenolat fordi de måles direkte i immunceller hvor legemidlet utøver sin effekt. Både farmakokinetisk og farmakodynamisk variasjon mellom pasienter vil påvirke utslaget i slike responsmålinger. Når man måler purinenes nivåer, får man et uttrykk for konsekvensen av at mykofenolat hemmer IMPDH. Derfor er det mulig at purinene kan gi et bedre estimat av mykofenolats effekt enn hva cellenes målte IMPDH-aktivitet gjør.

I denne oppgaven var hovedfokuset å studere nivåene av ulike purinnukleotider (målt som purinbaser) i lymfocytter hos levertransplanterte som brukte mykofenolat. Purinenes nivåer skulle undersøkes i kortsiktige perspektiv (timer) like etter dosering og i et mer langsiktig perspektiv (dager/uker) i tidlig fase etter levertransplantasjon. Dette skulle sees i sammenheng med mykofenolats effekt på IMPDH og mykofenolats farmakokinetikk i form av total og fri plasmakonsentrasjon. En nyutviklet LC-MS/MS-metode som ble tatt i bruk for å kvantifisere purinene, skulle valideres. Det overordnede formålet var å bidra til fagfeltet med ny og detaljert kunnskap om mykofenolats molekylære farmakodynamikk. En mer fremtidig hensikt er å kunne utvikle en analytisk metode som gjør det mulig med farmakodynamisk monitorering av mykofenolats immunsuppresjon hos transplanterte pasienter. Levertransplanterte er en gruppe pasienter som er studert i mye mindre grad

sammenlignet med nyretransplanterte, så denne oppgaven vil by på nye resultater i en retning som er lite studert tidligere.

### 3. Materialer

#### 3.1 Utstyr

Beskrivelse	Navn	Produsent
Celleteller	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter, Brea, CA
EDTA-rør	K <sub>2</sub> EDTA Tubes	BD Vacutainer Systems, Plymoth, UK
LC-MS/MS	Waters 2795 Separations Module, Waters Quattro micro API	Waters, Manchester, UK
HPLC system	Dionex Ultimate 3000 HPLC-System	Sunnyvale CA, USA
Inkubatorskap	Queue 2720	Leverandør: Heigar, Oslo, Norge
Kolonne HPLC	Ace 3 phenyl 15×4,6 mm, 3 µm	Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland
Kolonner LC-MS/MS	Atlantis T3 C18, 3 µm, 2,1 x 150 mm, Atlantis guard T3 C18, 3 µm, 2,1 x 10 mm.	Waters, Manchester, UK
Magnet	Dynal MPC-S/ MPS-L	Invitrogen, Carlsbad, CA
Mikrosentrifugerør (polypropylen)	Sarstedt Tube 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Tyskland

Sentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus instruments, Hanau, Tyskland
Sentrifuge til mikrosentrifugerør	Jouan BR4i	Thermo Scientific, Waltham, MA
Sentrifugerør	Falcon, 14 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Programvare LC-MS/MS	MassLynx	Waters, Manchester, UK
Programvare HPLC	Chromeleon	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Statistikk programvare	SPSS	SPSS Inc., Chicago, IL
Ultralydbad	Branson 1210	Branson, Dranbury, CT
Ultrafiltere	Amicon Centrifree MPS Regen Cellulose 30kD	Billerica, MA, USA
Vannbad	Grant ristevannsbad Modell OLS 200	Grant, Cambridge, UK
Varmeblokk	Techna Dri-Block, DB-3D	Techne, Cambridge, UK
Vortexmixer	Vortex Genie 2	Scientific industries INC, Bohemia, NY

---

### 3.2 Reagenser

Beskrivelse	Navn	Produsent
Acetonitril (ACN)	Acetonitrile, HPLC grade	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
$^{13}\text{C}_5$ -adenin	$^{13}\text{C}_5$ -Adenine	Larodan Fine Chem., Malmø, sverige
Adenosin monofosfat (AMP)	Adenosine 5'- monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Ammoniumacetat	Ammonium acetate, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Ditiotreitol	DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
D <sub>2</sub> -hypoxantin	D <sub>2</sub> -hypoxanthine	Cambridge Isotope Lab, Andover, MA
EDTA	EDTA, anhydrous	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Fosfatbufret saltvann	PBS, BioWhittaker	Lonza, Verviers, Belgia
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ -guanin	Guanine (8- $^{13}\text{C}$ , 7,9- $^{15}\text{N}_2$ )	Cambridge, Isotope Lab, Andover, MA
Guanosin monofosfat (GMP)	Guanosine 5'- monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO

Fosforsyre (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Ortophosphoric acid 85 %	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Inosin monofosfat (IMP)	Inosine 5'-monophosphate	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Isoleringskuler for CD+ celler	Dynal CD4 Positive Isolation Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA
Isoton væske til celletelling	Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Brea, CA
Kaliumacetat	Potassium acetate	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Kaliumhydroksyd	Kaliumhydroxide	VWR,
Kaliumklorid (KCl)	Potassium chloride	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Maursyre	Formic acid, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Methanol	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Mykofenolat	Mycophenolic acid	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Mykofenolat-glukoronoid	Mycophenolic Acid β-D- Glucuronide	Toronto Research Chemicals

Nikotinamid-adenindinukleotid	B-Nicotinamide adenine dinucleotide, hydrate	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Perklorsyre, konsentrert	Perchloric acid 70 %	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Tris-hydroklorid (Tris-HCl)	Trizma buffer substance	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
$^{15}\text{N}_2$ -xantin	Xanthine (1,3- $^{15}\text{N}_2$ )	Larodan Fine Chem, Malmø, sverige
Xantosin	Xanthosine (x2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO

---

Assay-buffer:

Tris-hydroklorid 250 mmol/L, EDTA 7,50 mmol/L, KCl 250 mmol/L og DTT 5,00 mmol/L.

IMP/NAD-løsning:

IMP 18 mmol/L og NAD 4,0 mmol/L.

Internstandardløsning:

$^{15}\text{N}_2$ -xantin 25,0  $\mu\text{mol/L}$ , D<sub>2</sub>-hypoxantin 25,0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -guanin 25,0  $\mu\text{mol/L}$  og  $^{13}\text{C}_5$ -adenin 25,0  $\mu\text{mol/L}$ .

Kaliumacetatløsning:

4,0 mol/L

Mobilfase:

Ammoniumacetat 2 mmol/L, maursyre 0,1 % (v/v), acetonitril 3 % (v/v) og vann 97 % (v/v).

Perklorsyre stoppreagens/fellingsreagens:

4,0 mol/L



**Kalibratorer:**

	Xantosin ( $\mu\text{mol/L}$ )	IMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )
Blank	0	0	0	0
Kalibrator 1	0,50	0,50	1,00	2,50
Kalibrator 2	2,50	1,00	5,00	12,5
Kalibrator 3	10,0	10,0	20,0	50,0
Kalibrator 4	50,0	40,0	100	250
Kalibrator 5	100	80,0	200	500

**Kontroller:**

	Xantosin ( $\mu\text{mol/L}$ )	IMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )
Kontroll lav	0,50	0,50	1,00	2,50
Kontroll medium	10,0	10,0	20,0	50,0
Kontroll høy	100	80,0	200	500

## 4. Metode

### 4.1 Studiedesign

Studien var en del av en større studie med tittelen ” Kvantitativ måling av albumin, total og fri fraksjon mykofenolsyre, samt måling av IMPDH i levertransplanterte pasienter”. Pål Aarstrand Reine ved Anestesiavdelingen, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet var prosjektansvarlig for hovedstudien. Hele studien ble utført ved Rikshospitalet, og den var på forhånd godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk. Det ble innhentet skriftlig informert samtykke fra alle deltagende pasienter.

Hensikten med hovedstudien var å studere hvordan fri fraksjon av mykofenolat påvirkes av albuminkonsentrasjonen, og videre hvordan konsentrasjonen av fri og total mykofenolat påvirker immuncellenes IMPDH-aktivitet. Studien var prospektiv, åpen og ikke randomisert. Pasientene som tilfredsstilte inklusjonskriteriene ble spurt om studiedeltakelse fortløpende etter operasjon. Inklusjonskriteriene krevde at pasientene skulle være levertransplantert og over 18 år. Pasientene skulle ikke bruke andre immunsuppressive medikamenter enn mykofenolat, takrolimus, steroider og eventuelt IL-2R-antistoff. De som tidligere hadde hatt colonkreft med spredning til lever, ble ikke inkludert. De inkluderte pasientene fikk samme behandling som de ville fått uten å delta i studien, men de ble belastet med noe ekstra blodprøvetaking på enkelte dager i perioden etter transplantasjon.

Fra hver pasient ble det tatt blodprøver fra sentralt venekateter på to ulike dager etter transplantasjon. Det ble tilstrebt å ta prøver på dag 2, 3 eller 4 og så 14 dager etter dette igjen. Blodprøver ble tatt rett før inntak av MMF og deretter i løpet av 4 timer etter doseinntak. Prøver til farmakodynamiske undersøkelser ble da tatt ved 0 – 1 – 2 -3 – 4 timer hvor CD4<sup>+</sup> celler ble isolert. Prøver til farmakokinetiske undersøkelser ble tatt ved 0- 0,5 – 0,75 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 – 3 -3,5 – 4 timer hvor plasma ble separert fra prøvene ved sentrifugering.

Alt prøvemateriale var samlet inn i perioden januar-august 2010, det vil si før oppstart av denne mastergradsoppgaven. Isolerte celler og plasma var oppbevart i fryser ved -20 °C.

## **4.2 Analyse av purinbaser og IMPDH-aktivitet i CD4+ celler**

### **4.2.1 Isolering av CD4+ celler**

De CD4+ cellene utgjøres i hovedsak av T-hjelperceller. Disse ble isolert fra EDTA-fullblod ved hjelp av magnetiske kuler (Dynabeads®) dekket med antistoff mot CD4-markøren. Celleisoleringen ble utført slik som beskrevet av Vethe *et al.* (51).

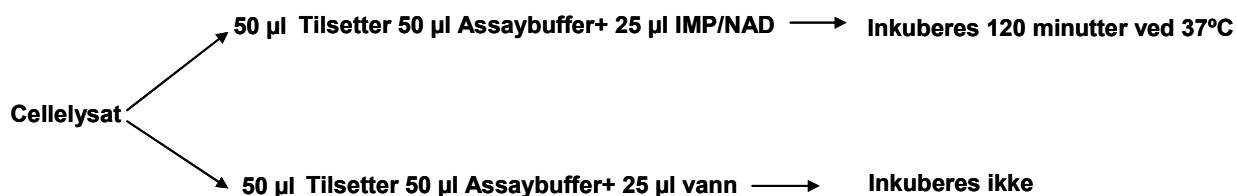
Hundre µL vasket kulesuspensjon ble overført til 4 mL EDTA-fullblod som på forhånd var avkjølt til ca. 4 °C. Dette ble blandet ved å vende prøveglasset 4-5 ganger. Glasset ble inkubert på rulle med rotasjon og tilting i 30 minutter ved 2-8 °C, og deretter satt på magnet i 2-3 minutter. Supernatanten ble pipettert av for å være kilde til filtrert plasma i et senere steg (det avpipetterte blodet ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 g, og den separerte plasmaen ble filtrert ved hjelp av sentrifugefilter på 0,1 µm som ble sentrifugert i 5 minutter ved 2000 g). Celle/kule-kompleksene ble vasket med 1 ml PBS tre ganger og deretter resuspendert i 400µL PBS.

Suspensjonen ble overført til 2 mL polypropylenrør med butt bunn, satt på magnet og PBS ble pipettert av. Celle/kule-kompleksene ble resuspendert i 500 µL 0,1 µm filtrert plasma og så inkubert i 30 minutter ved 37 °C, hvor lett vortexing ble utført halvveis inkuberingen (ved 15 minutter). Røret ble sentrifugert i 2 minutter ved 1500 g ved romtemperatur, deretter ble all supernatant pipettert forsiktig av med pasteurpipette. Celle/kule-kompleksene ble resuspendert i 150 µL PBS, så vortexet i ca. 3 sekunder til homogen suspensjon og 25 µL ble umiddelbart tatt ut til celletelling. Resten (125 µL) av suspensjonen stod i kjøleskap inntil tellinga var utført. Etter tellinga ble suspensjonen frosset ved -20 °C inntil den skulle analyseres. Suspensjonen (25 µL) som skulle telles, ble tilsatt 50 µL lyseringsvæske, vortexet i 5 sekunder og latt stående i 5 minutter. Dette lyserer de ytre cellemembranene som kulene er festet til, mens cellekjernene består. Røret ble så satt på magnet og 50 µL supernatant ble overført til 19,0 mL isoton løsning i tellebeger. Cellekjernene ble telt ved hjelp av en Coulter celleteller, hvor fortynningsfaktoren var 381 og partikkelstørrelsen 3-10 µm. Hver prøve ble telt to ganger og gjennomsnittsverdien ble benyttet.

### **4.2.2 Prøvebearbeidelse**

Cellene ble tatt ut fra frysen og tint i 20 minutter ved romtemperatur. Deretter ble lysatet homogenisert ved mekanisk røring med pipettespiss, vortexing i 30 sekunder og påfølgende 120 sekunder i ultralydbad. Etterpå ble lysatet vortexet i 10 sekunder og satt på magnet for at

magnetkulene i lysatet skulle dras inntil veggen på røret. Deretter ble 50 µL lysat overført til et 1,5 mL polypropylenrør og ytterligere 50 µL ble tilsatt et annet tilsvarende rør. De to rørene ble behandlet på forskjellig vis (se skisse nedenfor).



Figur 7. Skisse for hvordan rørene behandles

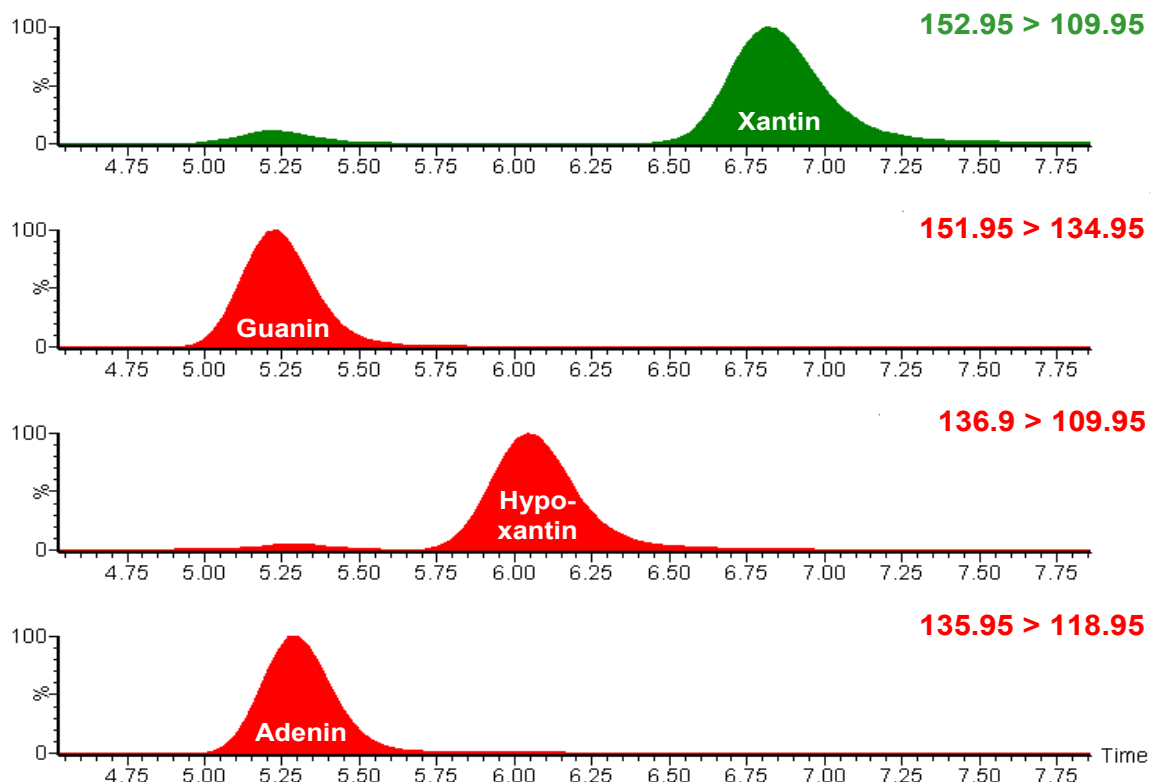
Til begge rørene ble det tilsatt 50 µL Assaybuffer som inneholdt Tris-HCL, EDTA, KCl og DTT. Det ene røret som skulle inkuberes, ble tilsatt 25 µL IMP/nikotinamid adenin dinukleotid (NAD)-løsning. IMP omdannes til xantin XMP via IMPDH, og NAD er en viktig kofaktor for enzymets aktivitet. Det andre røret som ikke skulle inkuberes, ble tilsatt 25 µL vann i stedet for IMP/NAD. Begge rørene ble vortexet i 5 sekunder for å blande innholdet.

Det ene røret ble inkubert i vannbad med temperaturen 37 °C i 120 minutter, mens det ikke-inkuberte cellelysatsat stod i romtemperatur i tilsvarende tid. I løpet av inkuberingstiden foregår den IMPDH-katalyserte reaksjonen, og etter 120 minutter ble prøven satt på is, sentrifugert (4 °C) i 20 sekunder ved 1200 g, og deretter tilsatt 20 µL perklorsyre 4,0 mol/L (HClO<sub>4</sub>) og 20 µL internstandardløsning inneholdende <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-xantin, D<sub>2</sub>-hypoxantin, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-guanin og <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-adenin. Det ikke-inkuberte røret ble også tilsatt perklorsyre og internstandardløsning, og herfra ble de to rørene behandlet likt. Perklorsyre virker som stoppreagens ved å felle ut proteiner. Rørene ble vortexet i 10 sekunder og sentrifugert (4 °C) ved 9400 g i 4 minutter. Et volum på 120 µL supernatant ble overført til glassinsert i vial og kork (snap-cap) ble satt på. Vialene ble satt i varmeblokk ved 100 °C i 60 minutter for å hydrolysere purinbasene fra ribosefosfatmolekylene. Etterpå ble prøvene kjølt ned til romtemperatur ved henstand i 10 minutter. Femten µL kaliumacetat 4,0 mol/L ble tilsatt og prøvene ble vortexet i 5 sekunder. Deretter ble vialene sentrifugert ved 2000 g i 5 minutter og plassert i kromatografiinstrumentets autosamplers.

### 4.3 Analyse av purinbaser ved hjelp av LC-MS/MS

Prøvene ble analysert ved hjelp av væskechromatografi koplet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Instrumentet som ble benyttet var en Waters 2795 Separations Module og en Waters Quattro micro API med elektropray ionisering. LC-modulen består av reservoar for mobilfase, pumpe, autosampler og injektor. Fra hver prøve injiseres et volum som følger mobilfasestrømmen til kolonnen. I kolonnen skjer en separasjon av ulike stoffer med bakgrunn i deres kjemiske egenskaper. I dette tilfellet ble omvendt-fase chromatografi benyttet. Det innebærer at kolonnematerialet er hydrofobt. Da vil de mest hydrofile stoffene gå raskt gjennom kolonnen, mens mer hydrofobe stoffer eluerer saktere ut av kolonnen på grunn av mer interaksjoner.

Mobilfasen bestod av 3 % acetonitril i vann med 0,1 % (v/v) maursyre og 2,0 mmol/L ammoniumacetat. Maursyre og ammoniumacetat virker som pH-stabiliserende buffer i mobilfasen, mens acetonitril bestemmer løsemiddelstryken. Kolonnen var en Waters Atlantis T3 C18, 3  $\mu$ m, 150  $\times$  2.1 mm og forkolonnen var Waters Atlantis T3 C18, 3  $\mu$ m, 10  $\times$  2.1 mm. Mobilfasehastigheten var 0,150 mL/min og injeksjonsvolum var 30  $\mu$ L. Injeksjonsnålen ble vasket med 5 % acetonitril mellom hver injeksjon. Prøvene ble injisert med 8 minutters mellomrom, og mobilfasen ble ført inn i massespektrometeret mellom 4,5 og 7,9 minutter.



Figur 8. Kromatogram for analyttene xantin, hypoxantin, guanin og adenin. Eksempelet viser LC-MS/MS-analyse av en kalibrator.

Elektrospray ble brukt som fordampings-/ioniseringsteknikk og positive ioner i gassfase ble ført inn i massespektrometeret. Kapillærspenningen ble satt til 3,00 kV, ionekildetemperaturen var 120 °C og gassfasetemperaturen var 400 °C. Nitrogen ble brukt som nebulisatorgass (650 L per time) og cone-gass (50 L per time). Molekylionene ble fragmentert ved hjelp av argongass justert til ca.  $3,5 \times 10^{-3}$  mBar. Betingelser for hvert enkelt molekylions masse/ladning ( $m/z$ )-overgang er angitt i tabell A.

**Tabell A. Betingelser for masse/ladning (m/z)-overganger**

Analytt (Internstandard)	Forløperion (m/z)	Produktion (m/z)	Dwell- tid (sek)	Cone- spenning (V)	Kollisjonsenergi (eV)
Xantin	152,95	109,95	0,350	32	17
( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -xantin)	154,95	110,97	0,350	34	17
Hypoxantin	136,90	109,95	0,300	40	20
(D <sub>2</sub> -hypoxantin)	138,98	110,98	0,300	40	18
Guanin	151,95	134,95	0,225	37	18
( <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -guanin)	154,96	137,96	0,225	35	17
Adenin	135,95	118,95	0,050	39	20
( <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -adenin)	141,03	123,91	0,050	39	20

Protonerte molekyllioner ble analysert ved hjelp av multiplere reaksjonsmonitorering (MRM).

Programvaren Waters MassLynx ble brukt til kvantifiseringen av purinbasene. Etter hver analyseserie ble alle kromatogrammene gjennomgått med hensyn til kromatografisk kvalitet (toppfasong) og eventuelle interferenser. Toppene i kromatogrammene ble integrert, og ratio mellom analyttenes og internstandardenes toppareal ble brukt som respons. Lineære kalibreringskurver med 1/x vektning (ikke tvunget gjennom origo) ble anvendt. Kalibratorenes konsentrasjoner var følgende: Xantosin 0,50 – 2,50 – 10,0 – 50,0 – 100 µmol/L, IMP 0,50 – 1,00 – 10,0 – 40,0 – 80,0 µmol/L, GMP 1,00 – 5,00 – 20,0 – 100 – 200 µmol/L, og AMP 2,50 – 12,5 – 50,0 – 250 – 500 µmol/L. Enzymaktiviteten av IMPDH ble beregnet som produksjonshastigheten av XMP, målt som xantin, gjennom inkuberingsintervallet (pmol/10<sup>6</sup> celler/minutt). Resultater under laveste kalibrator ble ekskludert.

#### 4.4 Analyse av fri og total mykofenolat

Plasma ble separert fra EDTA-fullblod (4 mL) ved hjelp av sentrifugering. Totalkonsentrasjon av mykofenolat ble opparbeidet ved hjelp av en proteinfellingsmetode. Førte  $\mu\text{L}$  plasma ble tilsatt 120  $\mu\text{L}$  0,276 % (v/v) fosforsyre i metanol og vortexet. Prøvene ble sentrifugert ved ca. 10 000 g i 10 minutter, og 120  $\mu\text{L}$  supernatant ble pipettert til vial. Fri mykofenolatkonsentrasjon ble ultrafiltrert gjennom 30 kD NMWL filter (4 000 g, 30 minutter, romtemperatur), og 40  $\mu\text{L}$  filtrat ble overført til vial hvor det på forhånd var tilsatt 40  $\mu\text{L}$  0,276 % (v/v) fosforsyre i metanol : vann 3:1. Vialen ble så vortexet. Videre analyse ble gjort ved hjelp av HPLC med UV-deteksjon (215 nm). Mobilfasen bestod av 75 % metanol tilsatt fosforsyre til pH 2,5, og denne ble pumpet med hastigheten 1,0 mL/min. Injeksjonsvolumet var 10  $\mu\text{L}$  og 25  $\mu\text{L}$  for henholdsvis total og fri mykofenolat, og run-tiden var 15 minutter per prøve. Kolonnen var en ACE-3 Phenyl 150  $\times$  4,6 mm. Chromeleon var programvaren som ble brukt til å styre HPLC-instrumentet.

Total mykofenolat ble kalibrert i området 0,50-32,0 mg/L med nedre validerte kvantifiseringsgrense 0,15 mg/L. Fri mykofenolat ble kalibrert i området 0,01-0,64 mg/L med nedre validerte kvantifiseringsgrense 0,01 mg/L. Metodens variasjonskoeffisient var < 7,0 % for total mykofenolat og < 10 % for fri mykofenolat.

#### 4.5 Validering

LC-MS/MS-metoden som ble brukt til å måle purinbaser, var tidligere utviklet og preliminært validert i laboratoriet. En grundigere validering av analysemetoden ble utført som en del av mastergradsoppgaven. Det ble brukt overskuddsmateriale fra allerede innsamlede rutineprøver til valideringen. Det innebar at ingen ekstra prøvetaking ble gjennomført. Prøvene ble anonymiserte ved at ingen pasientopplysninger ble registrert. Anvendelsen av det biologiske materialet var i tråd med godkjent bruk av "Diagnostikk- og behandlingsbiobank nr. 329" ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus. Prøver fra friske personer ble tatt etter informert samtykke.

##### 4.5.1 Carry-over

Carry-over ble undersøkt for å se om analyseresultatene påvirkes av overføring av analytter fra forrige prøve. Kontroller med kjent konsentrasjon ble satt opp i rekkefølgen lav<sub>a</sub>-høy-lav<sub>b</sub>. Dette ble gjentatt tre ganger i en serie, hvor sekvensene var adskilt med en blank vandig prøve. Carry-over ble kalkulert som følgende:  $(\text{lav}_b - \text{lav}_a) / (\text{høy} - \text{lav}_a) \times 100 \%$ . Det var ønskelig



at carry-over skulle være under 0,10 %, siden dette ville bidra til akseptabel nøyaktighet ( $\pm 20$  %) for målinger i det nedre området.

#### **4.5.2 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt**

Det kunne ikke brukes cellemateriale til kalibratorer, siden cellene allerede inneholdt ukjente konsentrasjoner av endogene purinbaser. Vandige kalibratorer måtte derfor benyttes. I denne sammenheng ble det undersøkt om cellematriks (PBMC) ville påvirke analyttens signalrespons. En slik påvirkning kalles matrikseffekt og opptrer oftest i form av undertrykte signaler, men også forsterkede signaler kan forekomme. Matrikseffekter skyldes interaksjoner mellom stoffer som eluerer samtidig inn i ionekilden. Her kan konkurranse med andre stoffer eller kompleksdannelse føre til at fordampings-/ioniseringseffektiviteten til analyttene endres. Isotopmerkede internstandarder oppfører seg i stor grad likt som korresponderende analytt, og de vil dermed minimere sannsynligheten for at analyseresultatene påvirkes.

Det ble satt opp fem serier hvor kalibratorer med kjente konsentrasjoner parallelt ble tilsatt til PBMC og vann. I hver enkelt serie var PBMC isolert fra en individuell transplantert pasient. Konsentrasjonene av purinbaser ble målt i prøvene, og stigningstall for toppareal analytt/internstandard versus tilsatt analyttkonsentrasjon ble sammenlignet.

#### **4.5.3 Linearitet for målt IMPDH-aktivitet**

Blodprøve fra en frisk frivillig person ble tatt og PBMC ble isolert på følgende måte: 4 mL EDTA-blod blandes i forholdet 1:1 med PBS (8 mL totalt). Fortynnet blod overføres til Leucosep-rør og sentrifugeres ved 1 000 g i 10 minutter uten bremseeffekt på slutten av sentrifugeringen. Øverste lag (plasma) pipetteres av, så pipetteres sjiktet med PBMC til 14 mL Falcon-rør. Deretter tilsettes 5 mL kald PBS og blandes forsiktig ved å vende røret seks ganger. Etterpå sentrifugeres suspensjonen ved 250 g i 10 minutter og supernatanten pipetteres fullstendig av slik at kun pelleten er igjen i bunnen (dette fjerner blodplater). Pelleten resuspenderes i 1 mL kald PBS. Et volum på 10  $\mu$ L tas ut til celletelling hvor det blandes med 19,0 mL isoton løsning med fortynningsfaktor 1901 og partikkelstørrelse 5-15  $\mu$ m. Resten av celsuspensjonen fryses ved -20 °C i LoBind-rør inntil analyse.

PBMC som ble isolert, ble fortynnet med PBS slik at vi fikk et stort intervall med forskjellig antall celler i området 200 000 celler/mL til 30 000 000 celler/mL. Etter at cellene ble

behandlet i følge prøvebearbeidelsen som er nevnt ovenfor, ble de analysert med hensyn til IMPDH-aktivitet.

#### **4.5.4 Impresisjon og nøyaktighet**

Innen-serie impresisjon og nøyaktighet ble vurdert ved å gjenta lav, middels og høy kontroll seks ganger innenfor en analyseserie. Impresisjon og nøyaktighet mellom serier ble undersøkt ved å analysere kontrollene like før og like etter pasientprøver i 24 ulike analyseserier. Målte konsentrasjoner av kontrollene ble sammenlignet med de tilsatte konsentrasjonene for å estimere nøyaktigheten. Impresisjonen ble angitt som de målte verdienes variasjonskoeffisient (VK: standardavvik/gjennomsnitt  $\times 100$  %). PBMC ble også isolert og slått sammen fra flere pasientprøver ("pooled"). Disse cellene ble dispensert i rør og frosset ved -20 °C. Senere ble de analysert innen en analyseserie (n = 6) og i flere serier (n = 6) for å beregne metodens VK for målt IMPDH-aktivitet.

#### **4.6 Statistikk og beregninger**

SPSS programvare ble brukt til å utføre statistiske tester. Statistisk signifikansnivå ble på forhånd satt til  $P < 0,05$  ved tosidig test. Wilcoxon signed-ranks test ble brukt til å vurdere intraindividuelle endringer (dag 4 vs. dag 17). Spearman's test ble brukt for å undersøke om korrelasjonen mellom variabler var statistisk signifikant.

AUC ble kalkulert ved hjelp av trapesmetoden.

## 5. Resultater

### 5.1 Metodevalidering

#### 5.1.1 Impresisjon og nøyaktighet

*Innen serie:* Det var på forhånd valgt å godta en VK på opptil 15 %. En serie der hvert kontrollnivå ble analysert seks ganger, dannet bakgrunn for beregning av innen-serie presisjon og nøyaktighet for analyttene xantin, hypoxantin, guanin og adenin. I disse analysene var VK lav og på sitt høyeste på 13,5 % for hypoxantin. Ellers var den lavere enn 6 % for de aller fleste kontrollene. Presisjon og nøyaktighet innen serier er angitt i tabell B

**Tabell B. Presisjon og nøyaktighet innen serie ved måling av purinbaser**

Analytt	Tilsatt konsentrasjon (µmol/L)	Variasjonskoeffisient (%)	Gjennomsnittlig nøyaktighet (%)	Antall
Xantin	0,50	4,8	104	6
	10,0	2,4	103	6
	100	1,3	100	6
Hypoxantin	0,50	13,5	93,7	6
	10,0	2,6	99,8	6
	80,0	2,1	99,1	6
Guanin	1,00	3,0	102	6
	20,0	0,8	97,6	6
	200	1,2	96,9	6
Adenin	2,50	6,1	107	6
	50,0	1,3	98,8	6
	500	1,7	99,3	6

Validering er utført ved å analysere vandige kontroller med kjente konsentrasjoner. Hver kontroll er analysert seks ganger i en analyseserie.

Variasjonskoeffisient = standardavvik/gjennomsnitt  $\times$  100 %.

*Mellom serier:* Det var på forhånd valgt å godta en VK på opptil 15 %. Tjuefire separate serier der hvert kontrollnivå ble analysert før pasientprøvene og etter pasientprøvene, dannet bakgrunn for beregning av mellom-serier presisjon og nøyaktighet for analyttene xantin, hypoxantin, guanin og adenin. I disse analysene var VK lav og på sitt høyeste på 9,6 % for hypoxantin. Ellers var den lavere enn 5 % for de aller fleste kontrollene. I én serie ble den lave hypoxantin-kontrollen ekskludert på grunn av dårlig kromatografi. Presisjon og nøyaktighet mellom serier er angitt i tabell C.

**Tabell C. Presisjon og nøyaktighet mellom serier ved måling av purinbaser**

Analytt	Tilsatt konsentrasjon (µmol/L)	Variasjonskoeffisient (%)	Gjennomsnittlig nøyaktighet (%)	Antall
Xantin	0,50	5,9	101	48
	10,0	3,0	101	48
	100	2,5	99,1	48
Hypoxantin	0,50	9,6	102	47*
	10,0	3,6	100	48
	80,0	4,9	99,0	48
Guanin	1,00	4,6	97,1	48
	20,0	2,0	99,0	48
	200	2,3	99,6	48
Adenin	2,50	6,1	99,7	48
	50,0	2,9	99,4	48
	500	3,1	99,3	48

Validering er utført ved å analysere vandige kontroller med kjente konsentrasjoner. Hver kontroll er analysert to ganger (før og etter pasientprøver) i 24 separate analyseserier.

Variasjonskoeffisient = standardavvik/gjennomsnitt  $\times$  100 %.

\* En kontroll av hypoxantin måtte ekskluderes på grunn av dårlig kromatografi.

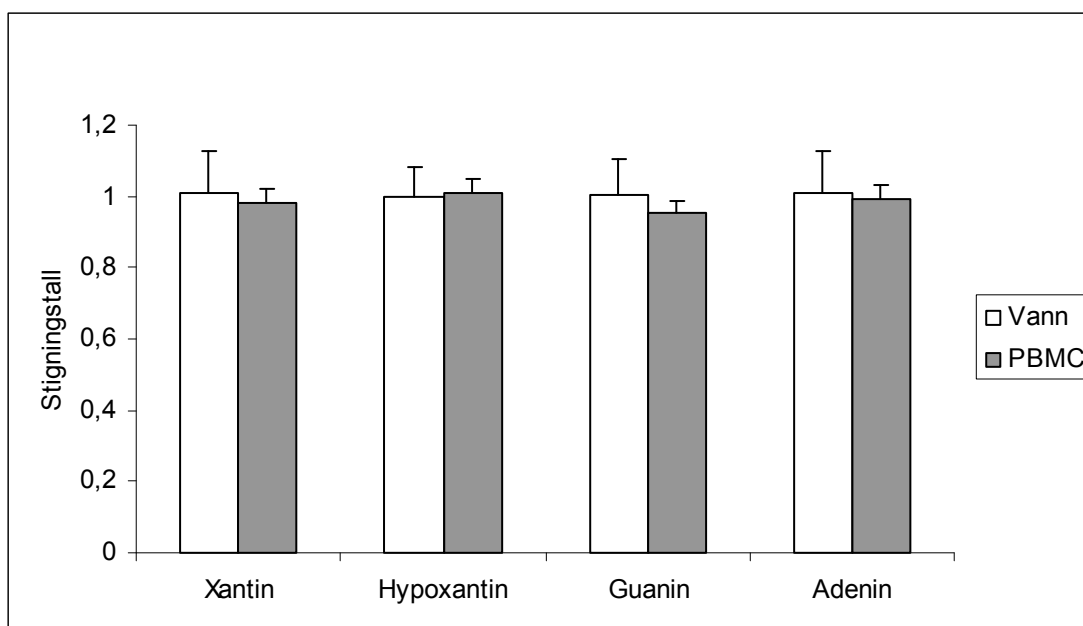
PBMC ble isolert fra pasientprøver, slått sammen til en pool og deretter dispensert i rør som ble oppbevart ved -20 °C. Disse kontrollene ble analysert for å undersøke presisjon for IMPDH-målingene. Seks separate serier ble satt opp som grunnlag for beregning av VK for målt IMPDH-aktivitet mellom seriene, mens en serie med seks paralleller var grunnlaget for beregning av VK innen serie. VK for målt IMPDH-aktivitet mellom serier var 22,4 % (gjennomsnittsnivå 5,42 pmol/10<sup>6</sup> celler/min) og innen serie var den 0,86 % (gjennomsnittsnivå 6,61 pmol/10<sup>6</sup> celler/min).

### **5.1.2 Carry-over**

Undersøkelsen viste svært lite carry-over. Den gjennomsnittlige graden av carry-over (n = 3 paralleller) ble regnet ut i prosent og var 0,04 % eller lavere for alle analyttene.

### **5.1.3 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt**

Det ble plottet grafer i Excel: Målte analyttkonsentrasjoner på Y-aksen mot tilsatte konsentrasjoner på X-aksen. Lineær regresjon ble utført og stigningstallet var utgangspunkt for å sammenligne analytt/internstandard i vann og cellematriks (PBMC). Dette ble gjort med PBMC isolert fra fem ulike pasientprøver i separate analyseserier. Gjennomsnittet av alle stigningstall (n = 5) ble beregnet og sammenlignet mellom vann og PBMC. Stigningstallene var tilsvarende i vann og PBMC, og de var nær 1,0 for alle analyttene (figur 9).



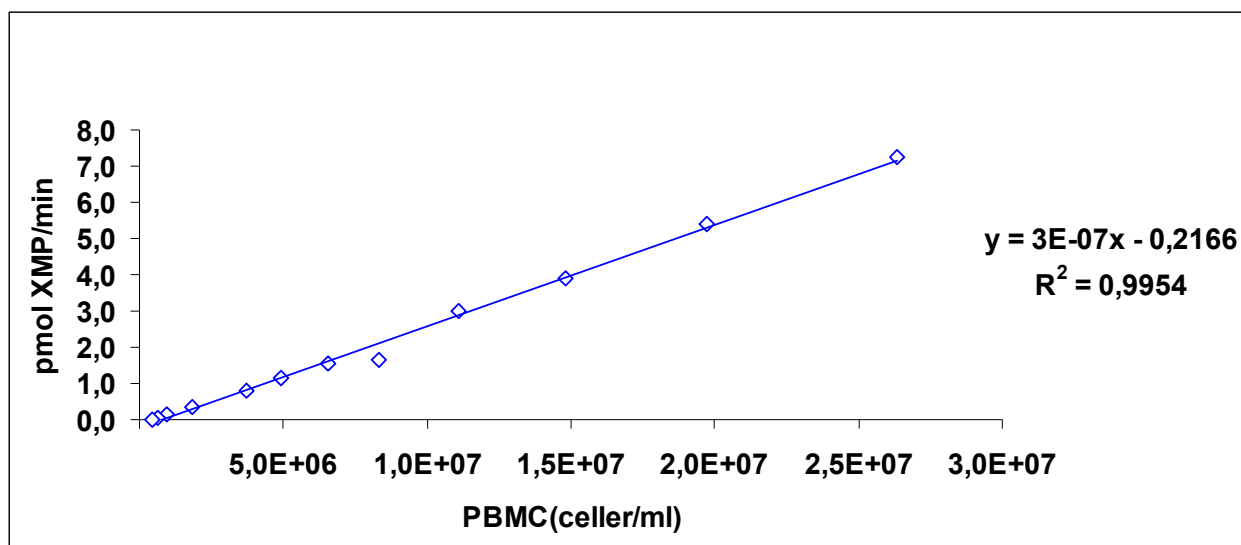
**Figur 9.** Stigningstall for purinbasenes signalrespons (analytt/internstandard) i vann vs. PBMC-lysat. PBMC var isolert fra fem ulike pasientprøver. Stigningstallet ble beregnet ved lineær regresjon. Gjennomsnitt (standardavvik).

#### 5.1.4 Korreksjon for xanteforekomst i IMP/NAD-løsning

Løsninger av IMP og NAD ble analysert hver for seg i en egen serie for å se om det var innhold av xantin i tørrstoffene. Det ble målt lave konsentrasjoner av xantin i IMP-løsningen (1,07  $\mu\text{mol/L}$ ). Dermed ble det bestemt å sette opp tre bakgrunnsprøver i hver serie for å estimere innholdet av xantin og trekke fra gjennomsnittet av de tre målingene.

#### 5.1.5 Linearitet

Seriene som ble satt opp for å teste linearitet mellom IMPDH-aktivitet og celletall, gav god korrelasjon. XMP-produksjonen korrelerte med celletallet, slik at høyere celletall ga høyere XMP-produksjon. Denne korrelasjonen ble tydelig sett for celletall mellom  $30 \times 10^6$  celler/mL (8,21 pmol/min) og helt ned til  $0,5 \times 10^6$  celler/mL (0,45 pmol/min), hvor lineær regresjon gav  $R^2 = 0,9954$ . For celletallet mellom  $0,5 \times 10^6$  celler/mL og  $0,2 \times 10^6$  celler/mL (0,43 pmol/min) var lineariteten dårligere ( $R^2 = 0,6908$ ) Derfor ble det bestemt å ekskludere pasientprøvene som hadde lavere celletall enn  $0,5 \times 10^6$  celler/mL eller tilsvarende lav XMP-produksjon.



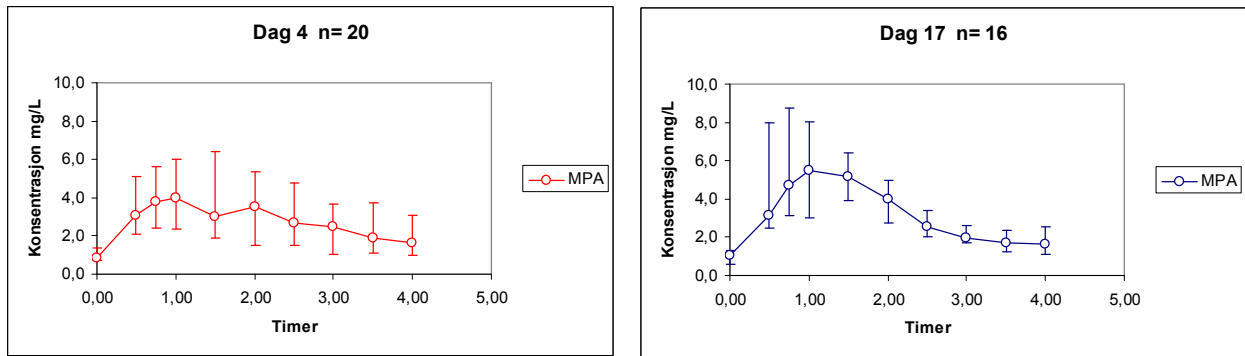
**Figur 10.** Linearitet mellom PBMC celler mellom  $0,5 \times 10^6$  celler/mL og  $30 \times 10^6$  celler/mL

## 5.2 Mykofenolats farmakokinetikk og farmakodynamikk hos levertransplanterte

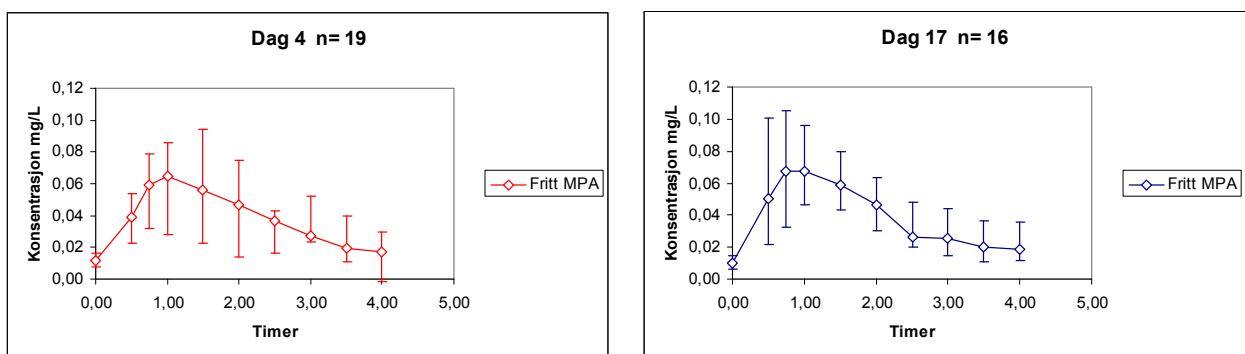
I studien ble 20 pasienter inkludert. De 20 pasientene stilte opp for prøvetaking ved median dag 4 (3-5) etter transplantasjon. Ved median dag 17 (16-18) deltok 16 av pasientene i studiens prøvetaking. Fire pasienter gikk ut av studien på grunn av medisinske årsaker. Av praktiske årsaker som helger, sykdom og lignende ble det noe variasjon med hensyn til dag for prøvetakingen, men basert på medianverdien for første og andre prøvetakingsdag vil disse videre bli referert til som dag 4 og dag 17 etter transplantasjon. I dataanalysene hvor variabler ble sammenlignet mellom dag 4 og dag 17, ble det kun inkludert pasienter som hadde aktuelt prøvesvar fra begge dagene.

### 5.2.1 Farmakokinetikk

Medianen av konsentrasjonsmålingene for total og fri mykofenolat i løpet av 0-4 timer etter inntak av MMF-dose ble plottet mot tiden for dag 4 og dag 17 (figur 11 og figur 12). Totalt var det foretatt 10 målinger innenfor hvert 0-4 timers intervall. Y-aksen på begge grafene er definert lik for lettere å kunne sammenligne konsentrasjonsforløpene mellom dag 4 og dag 17.



Figur 11. Total MPA konsentrasjon ved dag 4 og dag 17, målt 0-4 timer etter mykofenolat mofetil dose. Median (kvartiler).



Figur 12. Fri MPA konsentrasjon ved dag 4 og dag 17, målt 0-4 timer etter mykofenolat mofetil dose. Median (kvartiler).

De farmakokinetiske variablene som ble estimert og tatt i betraktning for å sammenligne dag 4 og dag 17, var  $C_0$ ,  $C_{\min}$ ,  $C_{\max}$ ,  $T_{\min}$ ,  $T_{\max}$  og  $AUC_{0-4t}$ . Ved dag 4 ble total mykofenolat målt hos 20 pasienter, men fri mykofenolat ble målt hos 19 pasienter på grunn av at en pasient hadde for lave verdier (under kvantifiseringsgrense). Ved dag 17 ble total og fri mykofenolat målt hos 16 pasienter. Tabell D er basert på medianverdiene for målingene og oppsummerer de farmakokinetiske variablene.

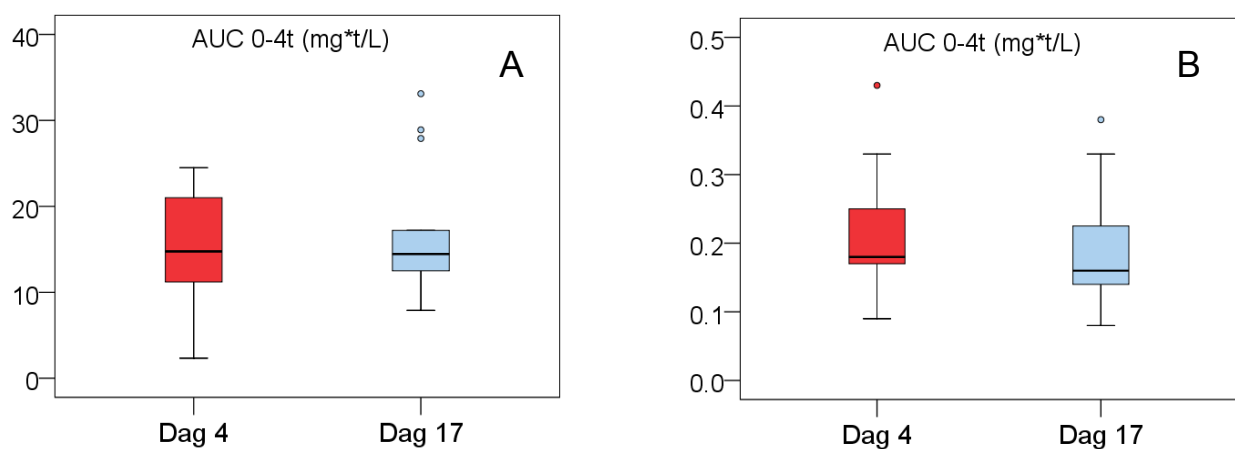


**Tabell D. Total og fri mykofenolat ved dag 4 og dag 17**

	<b>C<sub>0</sub></b>	<b>C<sub>min</sub></b>	<b>C<sub>maks</sub></b>	<b>T<sub>min</sub></b>	<b>T<sub>maks</sub></b>	<b>AUC<sub>0-4t</sub></b>
<b>MPA D4</b> (n = 20)	0,85 (0,18-13,6)	0,72 (0,14-3,57)	6,02 (0,81-13,6)	0 (0-4)	1 (0-4)	13,7 (2,34-24,5)
<b>MPA D17</b> (n = 16)	1,07 (0,15-6,09)	0,92 (0,14-4,41)	8,17 (2,86-22,1)	0 (0-4)	0,88 (0,5-4)	14,5 (7,87-33,1)
<b>Fri MPA D4</b> (n = 19)	0,01 (0-0,22)	0,01 (0-0,05)	0,09 (0,02-0,22)	2 (0-4)	1,5 (0-4)	0,18 (0,04-0,43)
<b>Fri MPA D17</b> (n = 16)	0,01 (0-0,04)	0,01 (0-0,04)	0,10 (0,05-0,30)	0,63 (0-4)	1 (0,5-4)	0,16 (0,08-0,38)

Farmakokinetiske variabler for total og fritt mykofenolat (MPA) ved median 4 dager og 17 dager etter levertransplantasjon. Median (min – maks).

Boxplot ble satt opp ved hjelp av SPSS for å sammenligne de viktigste variablene fra dag 4 med dag 17. Boxplot viser median, kvartiler, minimums- og maksimumsverdi og uteliggere (> 1,5 ganger boksens lengde målt fra enden av boksen). AUC<sub>0-4t</sub> for total og fri mykofenolat viste ikke signifikant nedgang eller økning fra dag 4 til dag 17 (Wilcoxon signed-ranks test).



Figur 13. Boxplot for AUC<sub>0-4t</sub> for sammenligning mellom dag 4 og dag 17. A) Total MPA AUC<sub>0-4t</sub>, n = 19. B) Fri MPA AUC<sub>0-4t</sub>, n = 16.

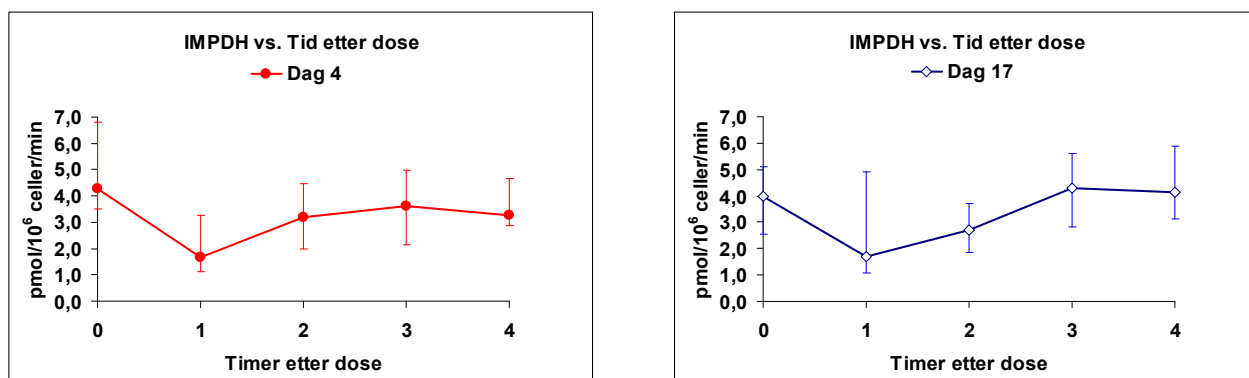
### 5.2.2 Farmakodynamikk

De farmakodynamiske variablene som ble studert, var IMPDH-aktivitet, hypoxantin, guanin og adenin, samt ratio mellom guanin og hypoxantin (gua/hxa). Basert på medianverdien av målingene for alle pasientene ble det plottet biomarkør-tidskurver for dag 4 og dag 17. Enkelte målinger måtte ekskluderes av tekniske grunner (for lave celletall eller under kvantifiseringsgrensen), men ved de fleste tidspunktene er det 20 målinger for dag 4 og 16 målinger for dag 17. En oversikt over de sentrale variablene for dag 4 og 17 er gitt i tabell E.

**Tabell E. Farmakodynamiske målinger ved dag 4 og dag 17 (median)**

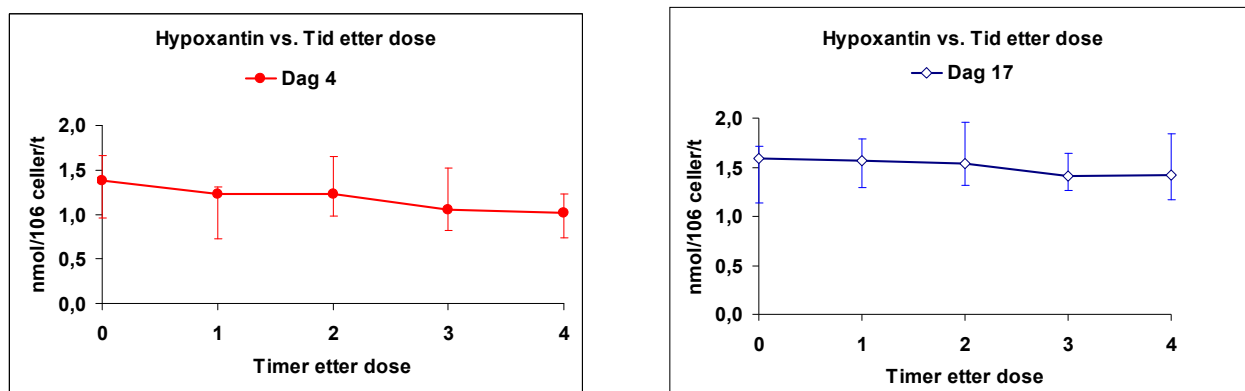
	Dag	Ved $t_0$	$T_{\min}$	$T_{\max}$	Min	Maks	$AUC_{0-4t}$
IMPDH pmol/ $10^6$ celler/min	D4	4,28	1	2	1,68	4,95	11,9
	D17	3,97	1	3	1,51	5,41	14,0
IMPDH % av $t_0$ - basalaktivitet	D4	51,1	1	2	17,9	55,0	140
	D17	49,8	1	3	19,2	69,1	181
Hypoxantin nmol/ $10^6$ celler	D4	1,38	3	1	0,75	1,44	4,73
	D17	1,59	1,5	2	1,23	1,89	6,03
Guanin nmol/ $10^6$ celler	D4	3,06	2,0	2,0	2,53	3,95	13,5
	D17	2,32	1,0	2,5	2,37	3,19	10,8
Adenin nmol/ $10^6$ celler	D4	3,30	2,5	2,0	2,72	4,07	14,1
	D17	2,21	1,0	3,0	2,22	3,37	10,5
Gua/Hxa Ratio	D4	2,67	1,00	3,00	2,10	4,42	11,2
	D17	1,66	1,00	3,00	1,41	2,23	7,21

IMPDH-aktivitet i tidsintervallet 0-4 timer etter mykofenolat mofetil dose er vist for dag 4 og dag 17 i figur 14. Minimum IMPDH-aktivitet inntraff ved median 1 time etter MMF-dose. Tre timer etter dose var enzymaktiviteten tilsvarende som ved  $t_0$ .

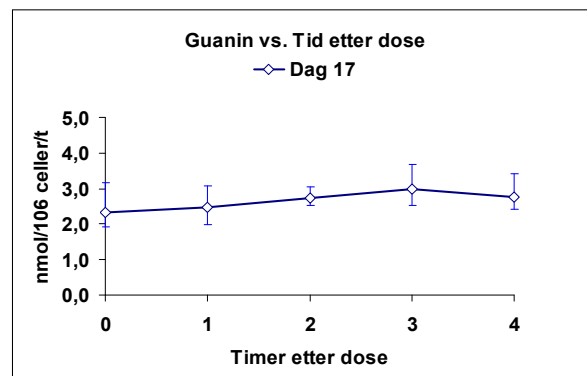
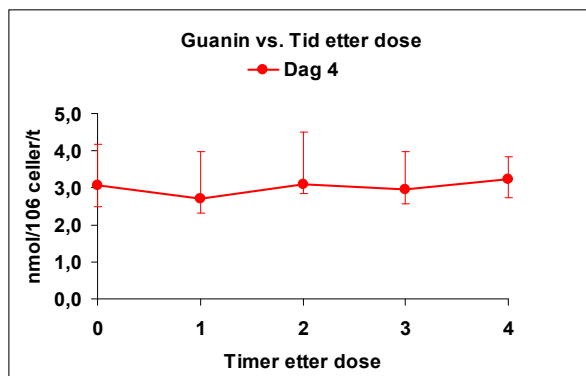


Figur 14. IMPDH-aktivitet i CD4+ celler i tidsintervallet 0-4 timer etter inntatt mykofenolat mofetil dose. Tjue pasienter inngikk ved dag 4, og 16 pasienter ved dag 17. Median (kvartiler)

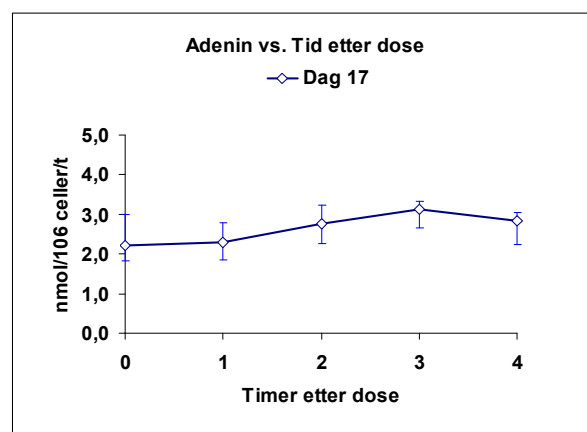
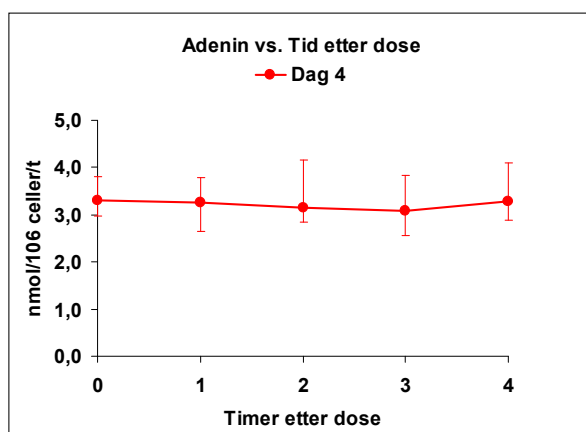
Nivåene av hypoxantin, guanin og adenin i tidsintervallet 0-4 timer etter MMF-dose var forholdsvis stabile, både ved dag 4 og dag 17 (figur 15-17).



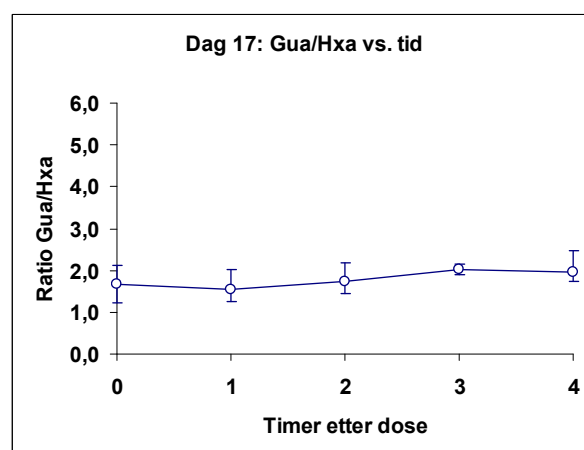
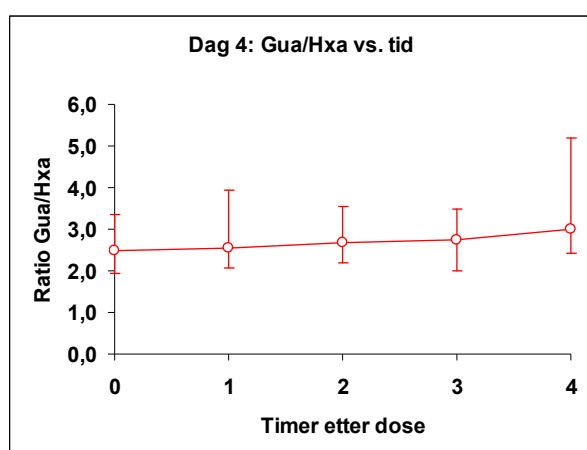
Figur 15. Hypoxantin i CD4+ celler i tidsintervallet 0-4 timer etter inntatt mykofenolat mofetil dose. Tjue pasienter inngikk ved dag 4, og 16 pasienter ved dag 17. Median (kvartiler)



Figur 16. Guanin i CD4+ celler i tidsintervallet 0-4 timer etter inntatt mykofenolat mofetil dose. Tjue pasienter inngikk ved dag 4, og 16 pasienter ved dag 17. Median (kvartiler)



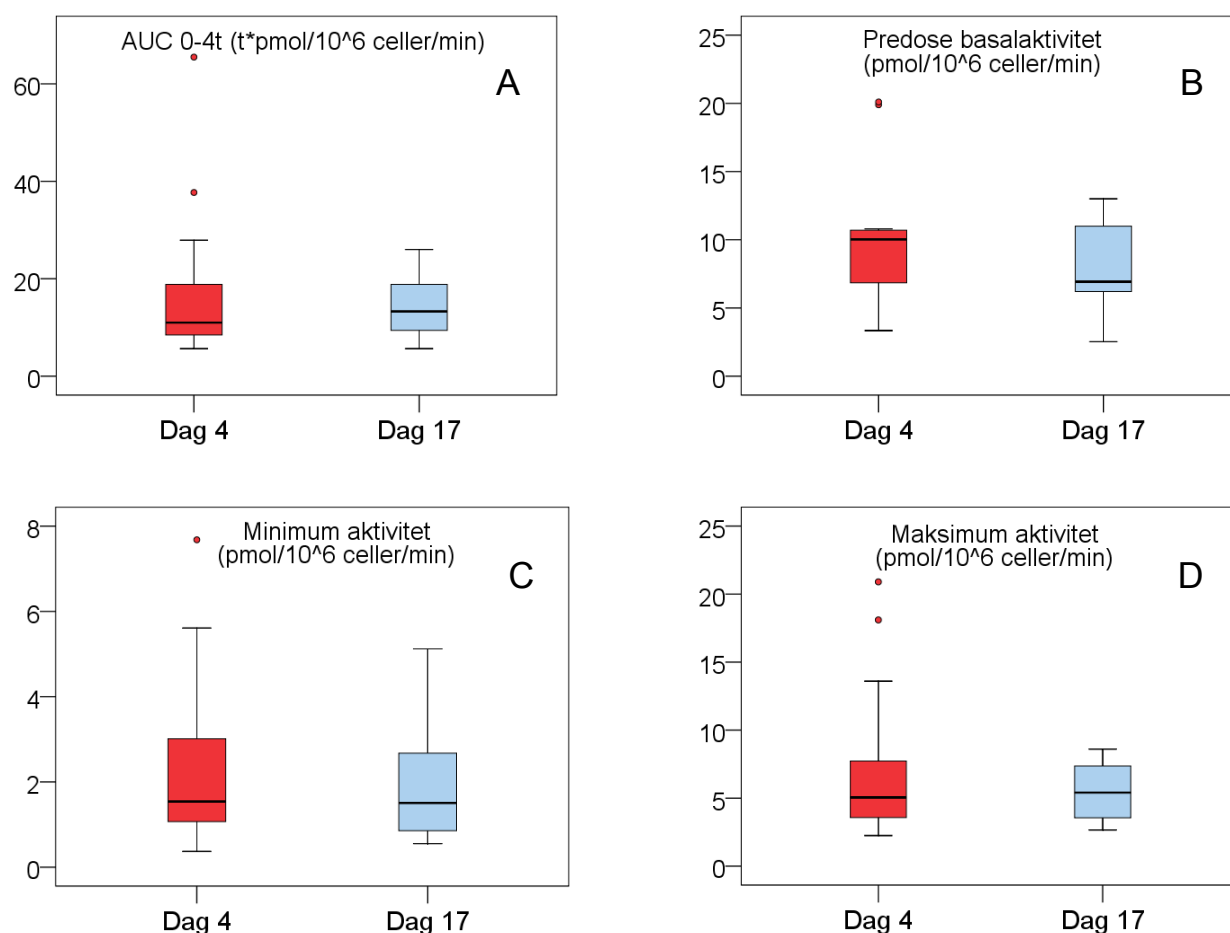
Figur 17. Adenin i CD4+ celler i tidsintervallet 0-4 timer etter inntatt mykofenolat mofetil dose. Tjue pasienter inngikk ved dag 4, og 16 pasienter ved dag 17. Median (kvartiler)



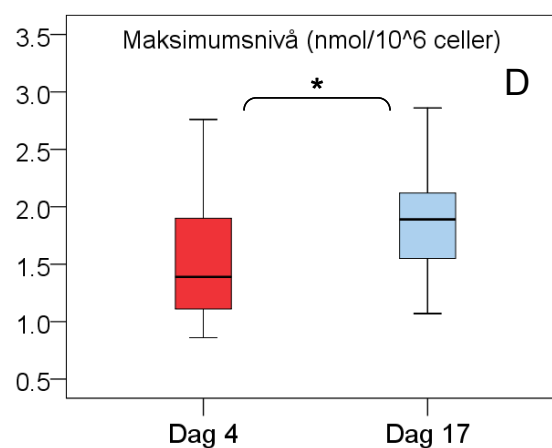
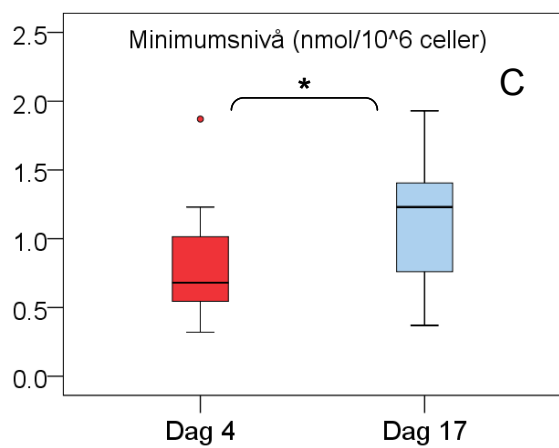
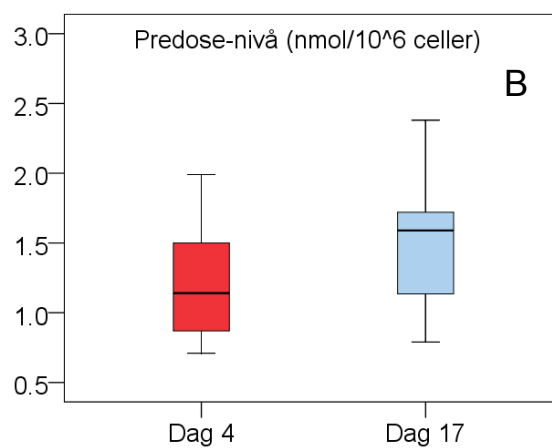
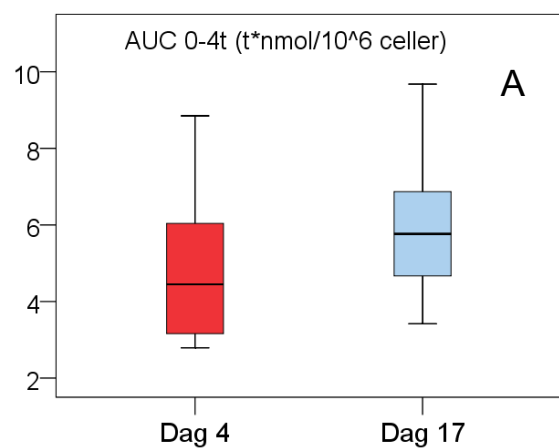
Figur 18. Guanin/hypoxantin-ratio i CD4+ celler i tidsintervallet 0-4 timer etter inntatt mykofenolat mofetil dose. Tjue pasienter inngikk ved dag 4, og 16 pasienter ved dag 17. Median (kvartiler)

For å sammenligne variablene ved dag 4 og dag 17 ble det laget boxplot (figur 19-23). Forskjeller ble undersøkt ved Wilcoxon signed-ranks test for parrede data (SPSS). Det var en signifikant økning ( $P < 0,05$ ) både for  $C_{\min}$  og  $C_{\max}$  for hypoxantin fra dag 4 til dag 17. Det var en signifikant ( $P < 0,05$ ) nedgang i guanin  $AUC_{0-4 \text{ timer}}$  fra dag 4 til dag 17. For adenin var nedgangen signifikant ( $P < 0,05$ ) for  $AUC_{0-4 \text{ timer}}$  og predosenivå, mens nedgangen var signifikant på  $P < 0,01$  nivå for  $C_{\min}$  ved sammenligning av dag 4 med dag 17.

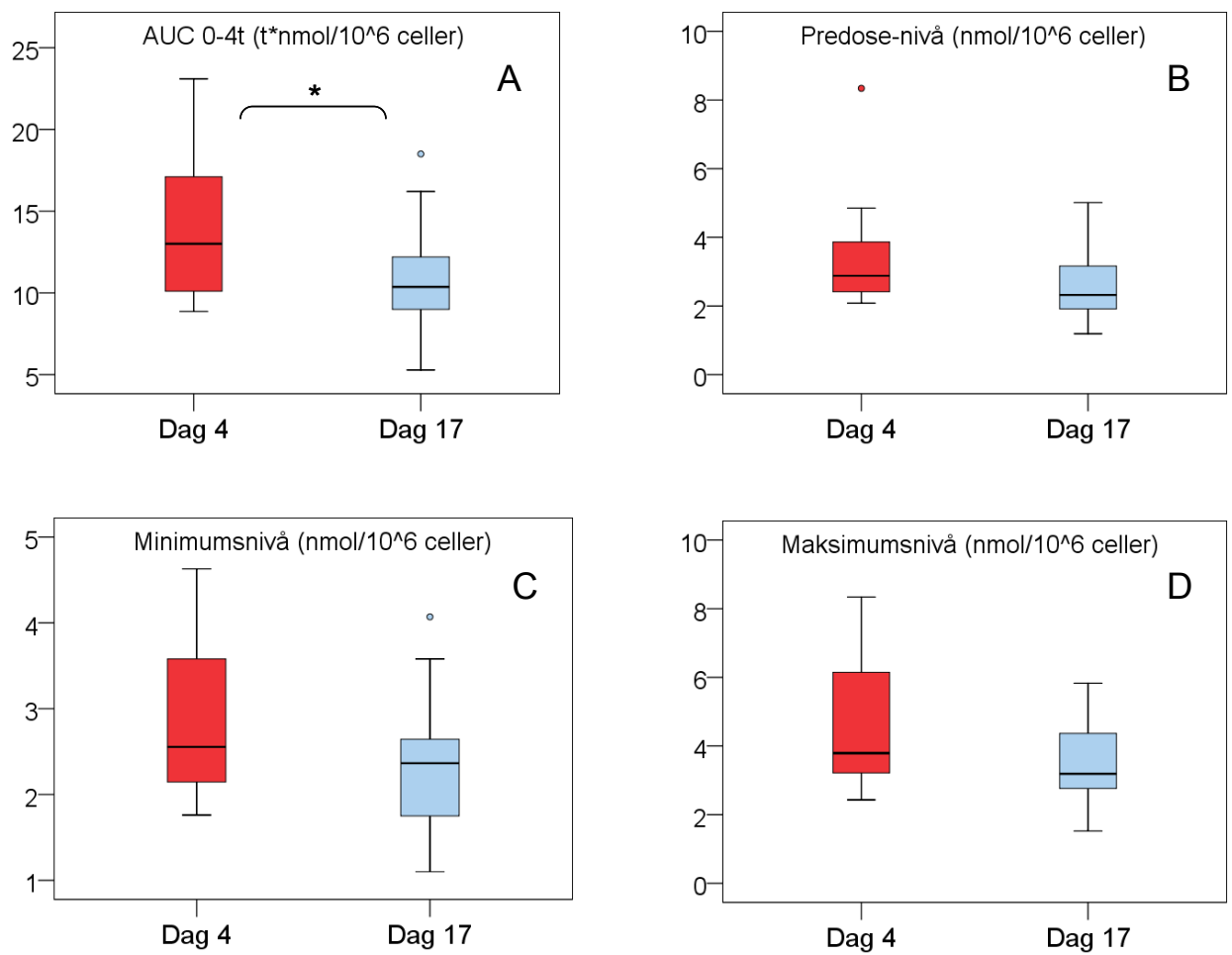
Guanin/hypoxantin-ratio viste seg å være betydelig forskjellig mellom dag 4 og dag 17. Signifikant ( $P < 0,05$ ) nedgang i verdien for  $AUC_{0-4 \text{ timer}}$ , mens predosenivå og  $C_{\max}$  hadde signifikantnivå på  $P < 0,01$  og  $C_{\min}$  på  $P < 0,001$ . Ratioen var lavere ved dag 17, og det skyldes at de målte hypoxantin-konsentrasjonene økte, mens guanin konsentrasjonene avtok.



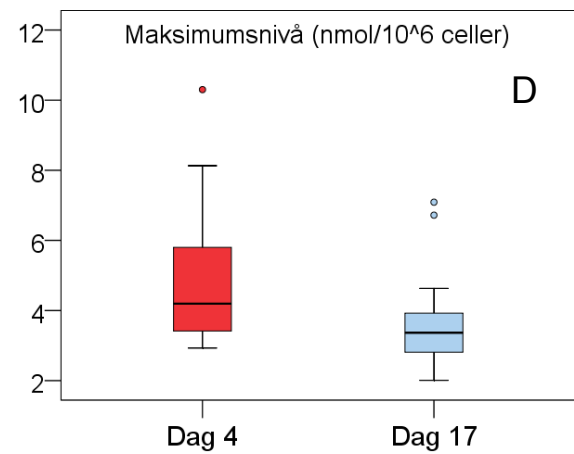
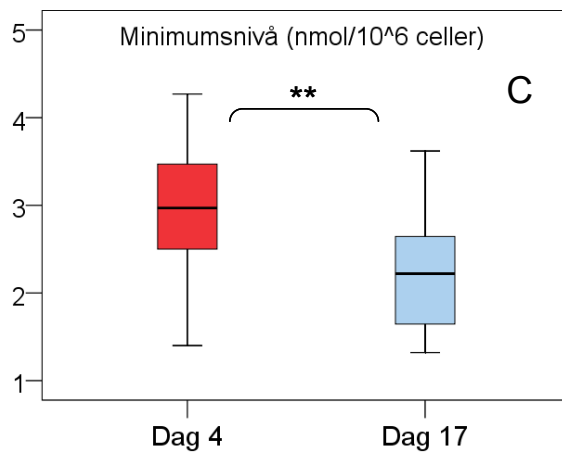
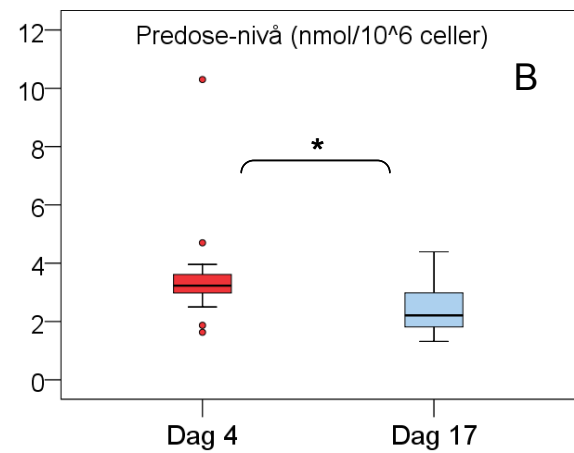
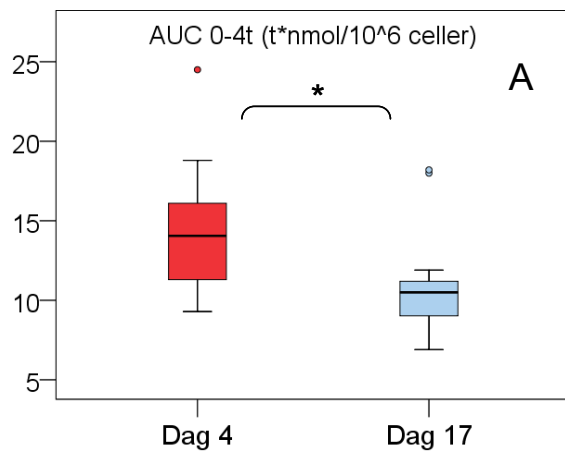
Figur 19. Boxplot for IMPDH-aktivitet. A)  $AUC_{0-4t}$ . B) Predose basalaktivitet av IMPDH; (mykofenolat utvasket for å regne ut basalaktivitet). C) Minimum aktivitet av IMPDH i tidsintervallet 0-4 timer. D) Maksimum aktivitet av IMPDH i tidsintervallet 0-4 timer



Figur 20. Boxplot for hypoxantinnivå. A) AUC<sub>0-4t</sub>. B) Predose nivå av hypoxantin. C) Minimum nivå av hypoxantin i tidsintervallet 0-4 timer. D) Maksimum nivå av hypoxantin i tidsintervallet 0-4 timer.  
\* P<0.05.

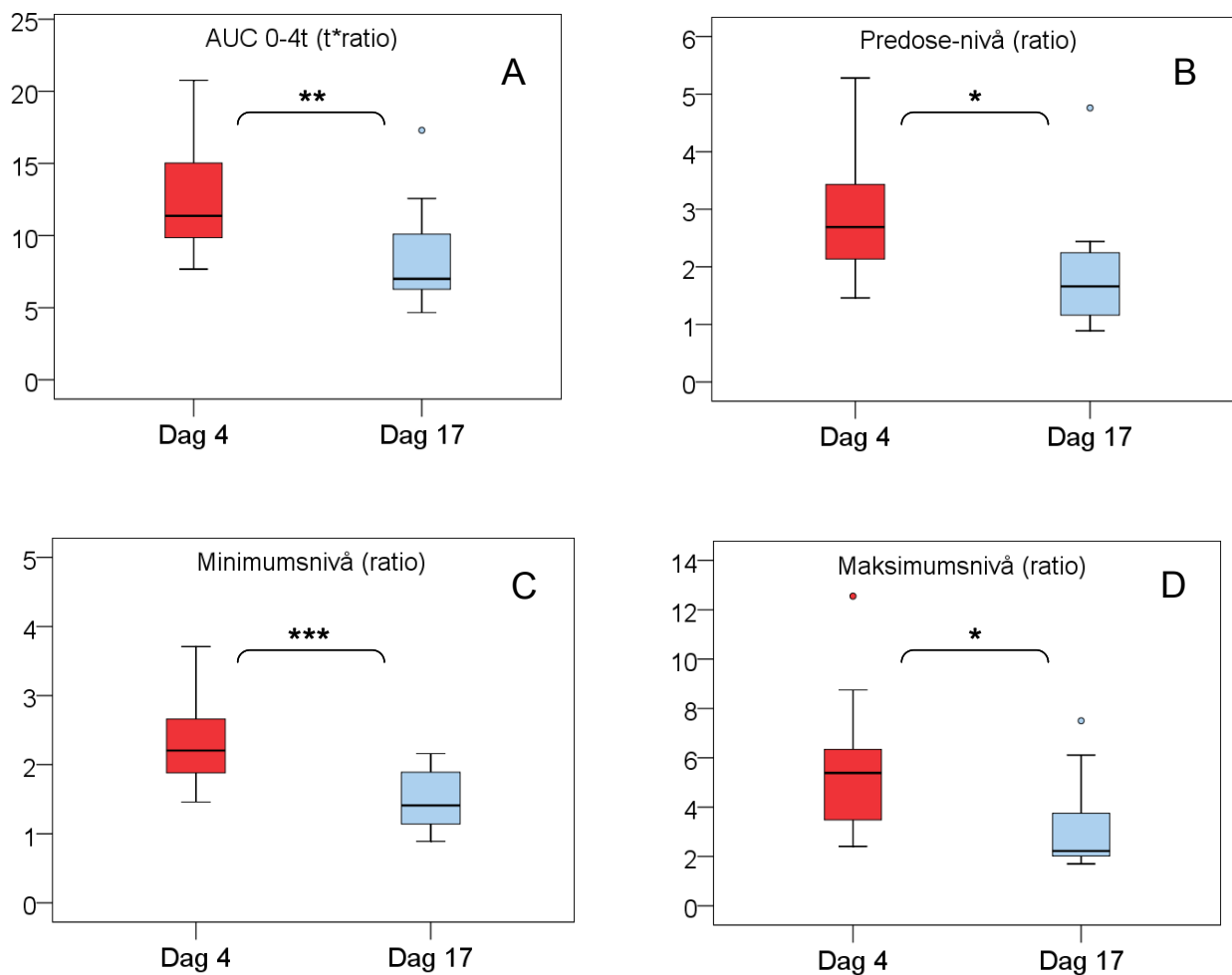


Figur 21. Boxplot for guanin nivå. A)  $AUC_{0-4t}$ . B) Predose nivå av. C) Minimum nivå av guanin i tidsintervallet 0-4 timer. D) Maksimum nivå av guanin i tidsintervallet 0-4 timer. \*  $P < 0.05$ .



Figur 22. Boxplot for adenin nivå. A) AUC<sub>0-4t</sub>. B) Predose nivå av adenin. C) Minimum nivå av adenin i tidsintervallet 0-4 timer. D) Maksimum nivå av adenin i tidsintervallet 0-4 timer. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01.

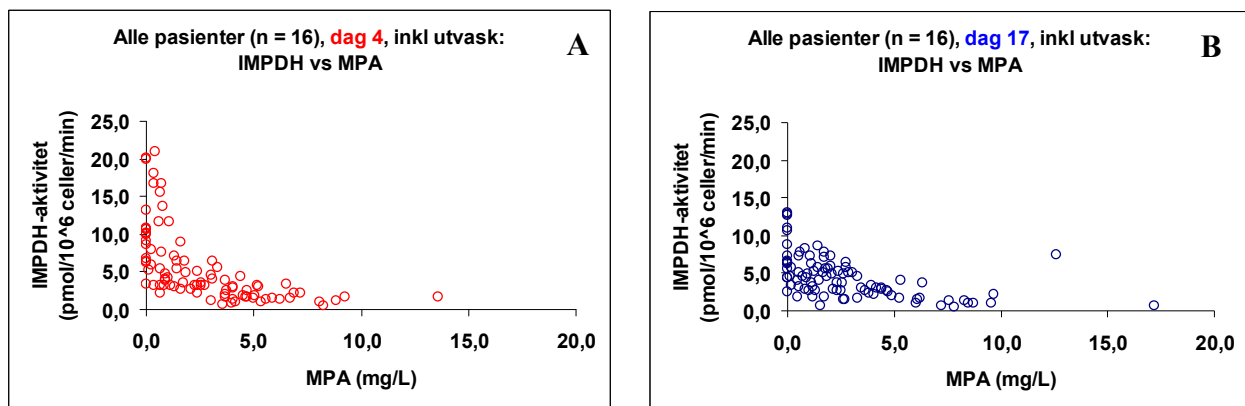




Figur 23. Boxplot for guanine/hypoxantin ratio. A) AUC<sub>0-4t</sub>. B) Predose nivå av guanin/hypoxantin. C) Minimum nivå av guanin/hypoxantin i tidsintervallet 0-4 timer. D) Maksimum nivå av guanin/hypoxantin i tidsintervallet 0-4 timer. \*P < 0.05. \*\*P < 0.01. \*\*\*P < 0.001

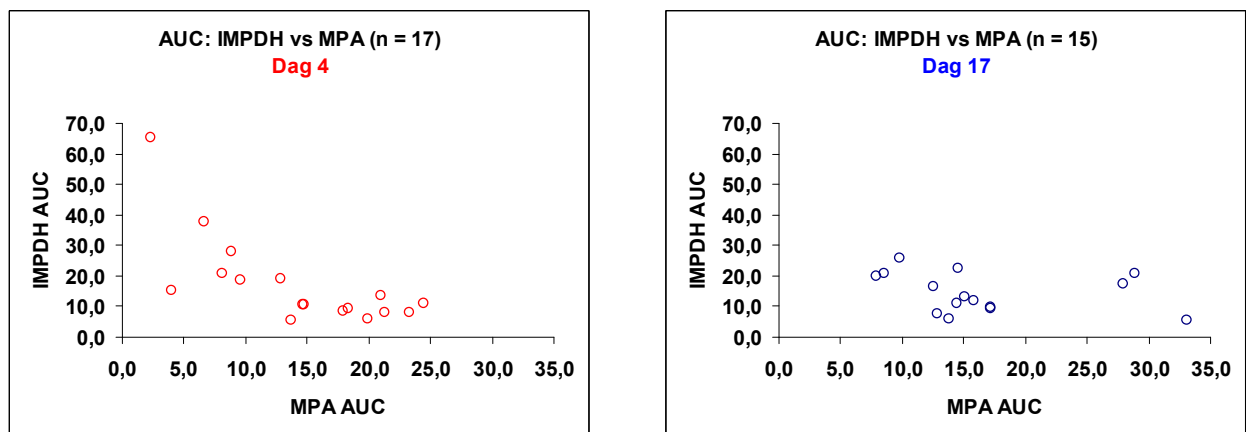
### 5.2.3 Farmakodynamikk versus farmakokinetikk

Da mykofenolatkonsentrasjonen ble plottet (for hvert enkelt punkt mellom 0-4 timer) mot IMPDH-aktiviteten, så ble det observert en non-lineær sammenheng. Denne sammenhengen var mer utpreget for dag 4 sammenlignet med dag 17 etter transplantasjon. En annen viktig forskjell i denne forbindelse var at IMPDH-aktiviteten synes å være høyere for noen enkeltmålinger ved lave mykofenolatkonsentrasjoner på dag 4.

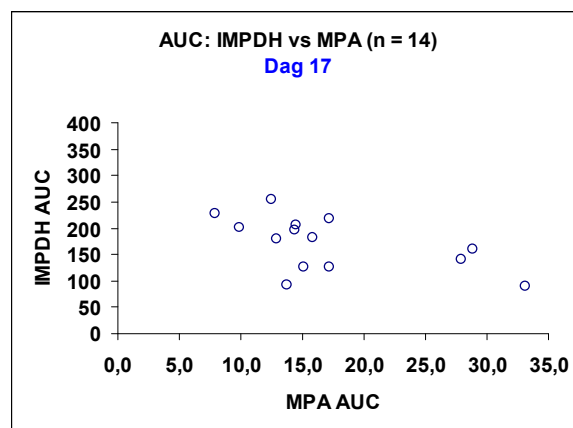
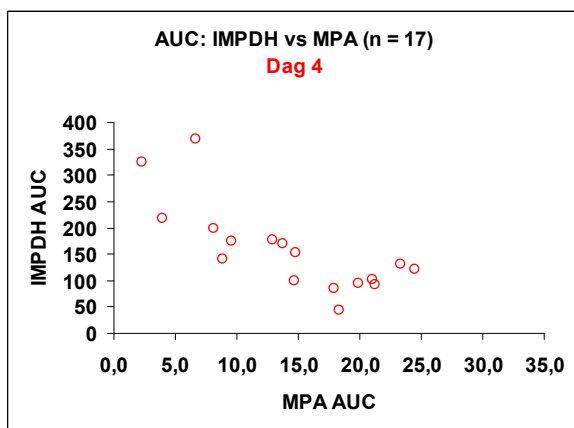


Figur 24. IMPDH-aktivitet vs. total MPA-konsentrasjon for alle enkeltmålinger ved henholdsvis dag 4 (A) og dag 17 (B). I de utvaskede prøvene ble MPA fjernet for å måle IMPDH-basalaktivitet.

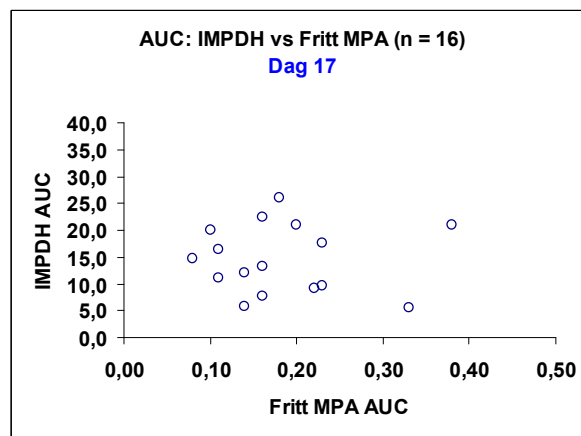
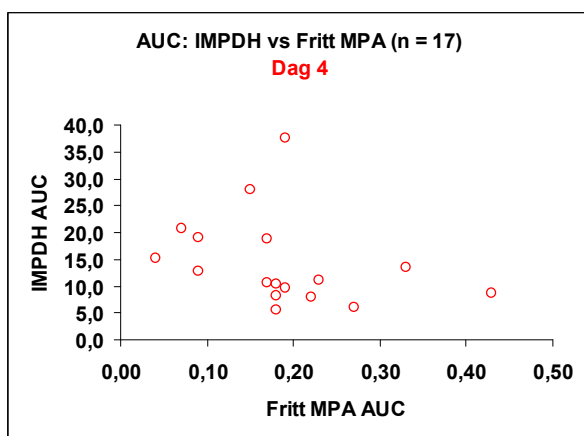
Sammenhenger mellom total og fri mykofenolat  $AUC_{0-4t}$  plottet mot IMPDH  $AUC_{0-4t}$  og guanin  $AUC_{0-4t}$  ble undersøkt. Det syntes å være en non-lineær sammenheng mellom mykofenolat AUC og IMPDH AUC ved dag 4, men mer utydelig ved dag 17. Plottene av mykofenolat AUC mot guanin og hypoxantin AUC viste ingen tydelige sammenhenger for verken dag 4 eller dag 17.



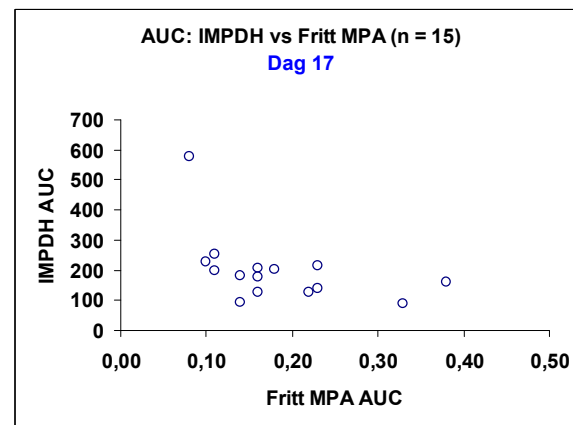
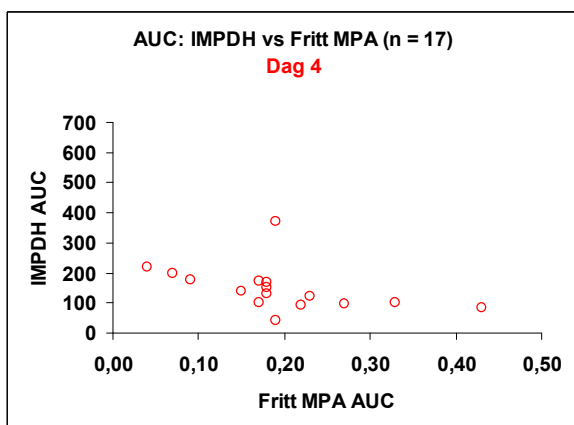
Figur 25. Sammenheng mellom total MPA  $AUC_{0-4t}$  og IMPDH  $AUC_{0-4t}$ . Enheten på x-aksen er  $mg \cdot t/L$  og på y-aksen  $t \cdot pmol/10^6$  celler/min



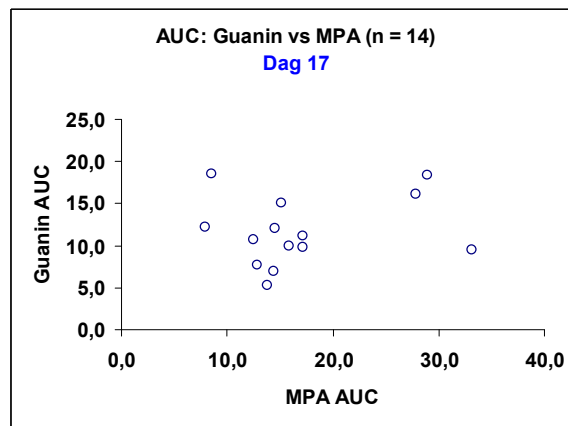
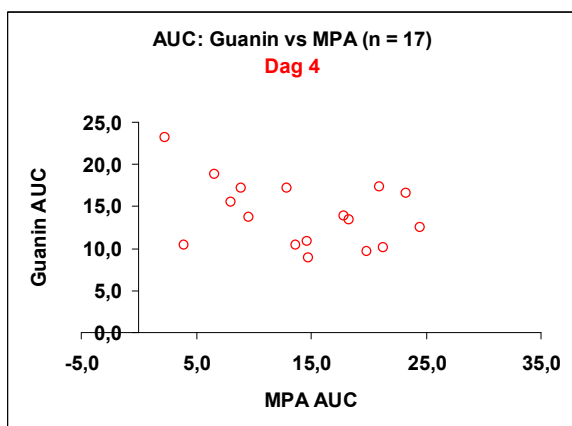
Figur 26. Sammenheng mellom total MPA AUC<sub>0-4t</sub> og relativ IMPDH AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er mg\*t/L og på y-aksen t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min. Relativ IMPDH-aktivitet er regnet ut ved å dele IMPDH-aktivitet/IMPDH-basalaktivitet x 100 %.



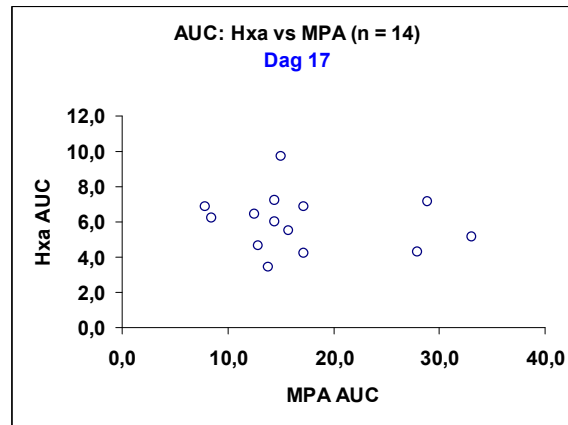
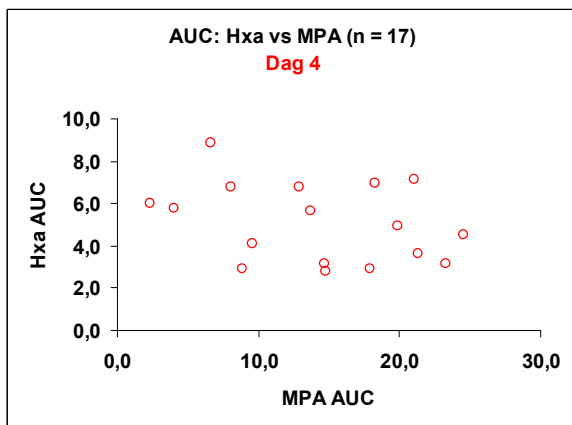
Figur 27. Sammenheng mellom fri MPA AUC<sub>0-4t</sub> og IMPDH AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er mg\*t/L og på y-aksen t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min.



Figur 28. Sammenheng mellom fri MPA AUC<sub>0-4t</sub> og relativ IMPDH AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er mg\*t/L og på y-aksen t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min. Relativ IMPDH-aktivitet er beregnet ut på basis av hemningsgraden i forhold til utgangsaktiviteten.

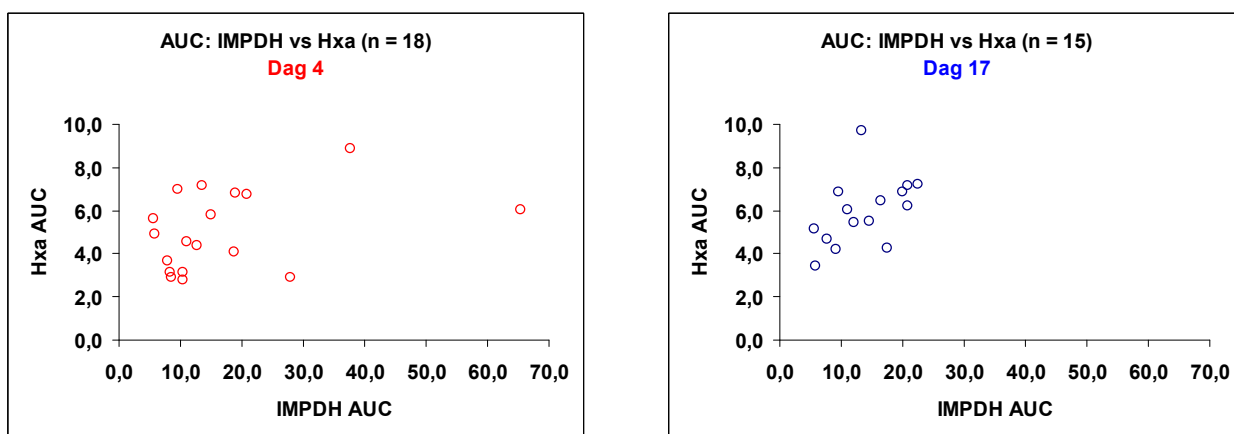


Figur 29. Sammenheng mellom total MPA AUC<sub>0-4t</sub> og guanin AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er t\*mg/L mens y-aksene er t\*nmol/10<sup>6</sup> celler.

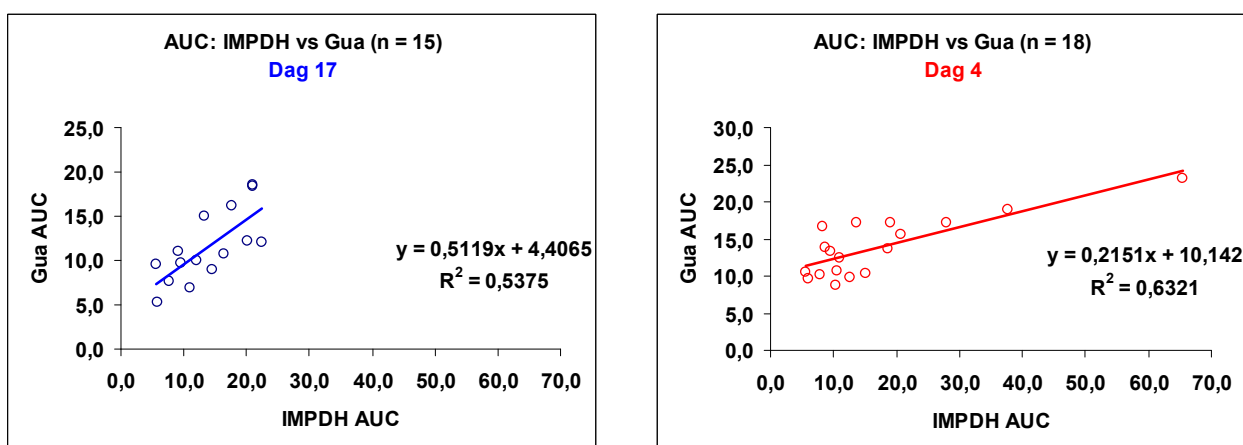


Figur 30. Sammenheng mellom total MPA AUC<sub>0-4t</sub> og hypoxantin AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er mg\*t/L og på y-aksen t\*nmol/10<sup>6</sup> celler.

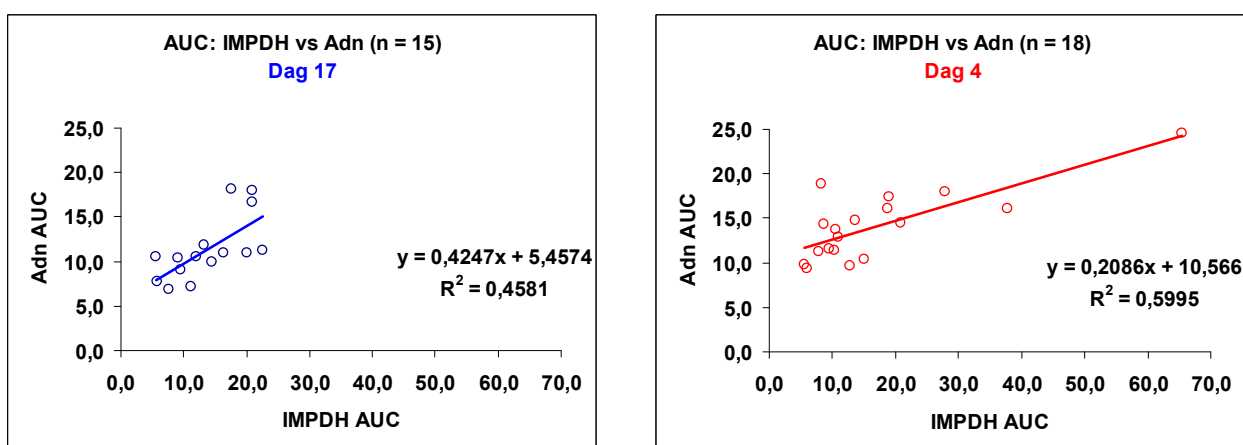
Sammenhenger mellom de forskjellige biomarkørene ble også undersøkt (figur 31-36). Hypoxantin AUC korrelerte i liten grad med IMPDH AUC både ved dag 4 og dag 17. Guanin AUC plottet mot IMPDH AUC viste derimot en signifikant korrelasjon for både dag 4 og dag 17 (Spearman's P-verdi henholdsvis 0,002 og 0,001). For adenin ble det også observert en signifikant sammenheng i forhold til IMPDH (Spearman's P-verdi 0,006 og 0,001 ved dag 4 og dag 17).



Figur 31. Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og hypoxantin AUC<sub>0-4t</sub>. Enheten på x-aksen er t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min mens y-aksene er t\*nmol/10<sup>6</sup> celler.

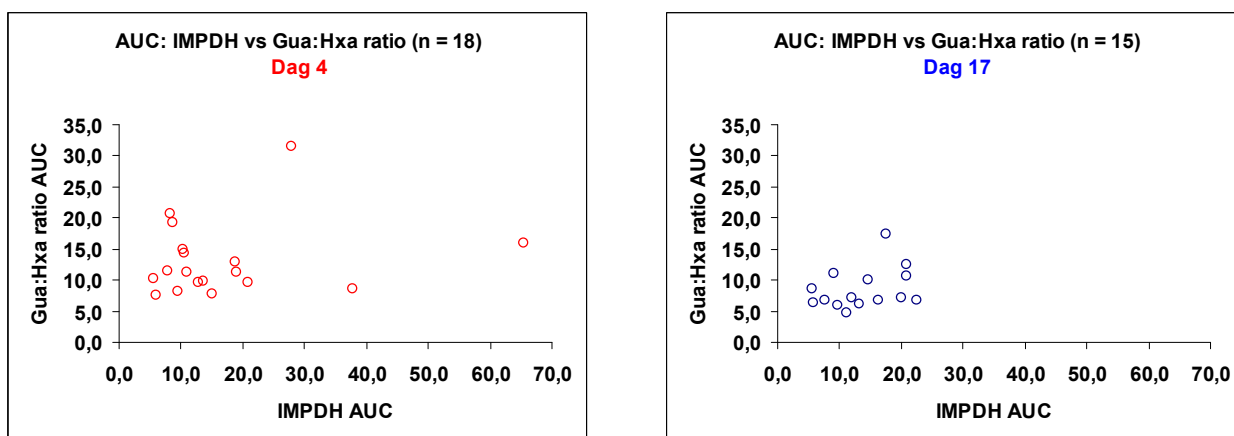


Figur 32. Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og guanin AUC<sub>0-4t</sub> undersøkt ved lineær regresjonsanalyse. Enheten på x-aksen er t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min mens y-aksene er t\*nmol/10<sup>6</sup> celler.

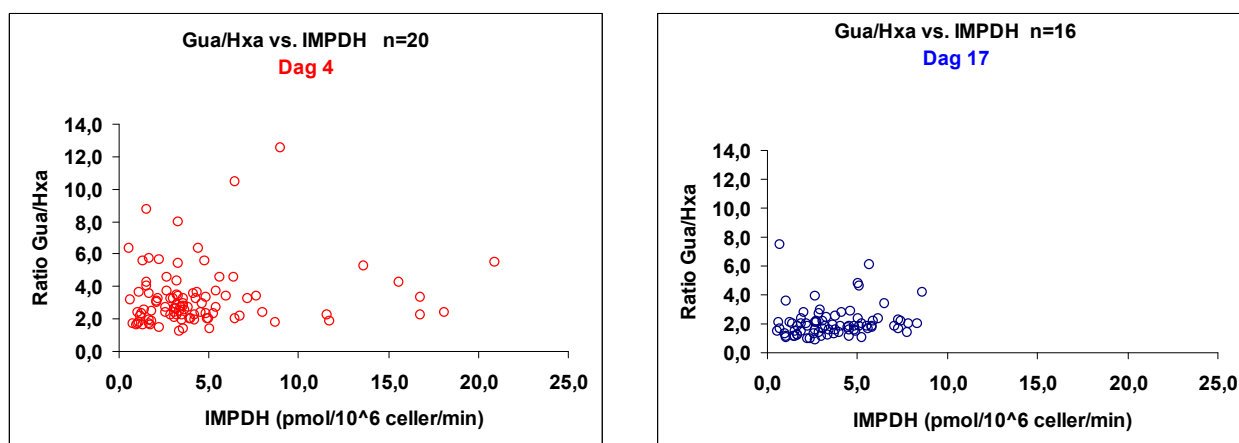


Figur 33. Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og adenin AUC<sub>0-4t</sub> undersøkt ved lineær regresjonsanalyse. Enheten på x-aksen er t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min mens y-aksene er t\*nmol/10<sup>6</sup> celler.

Når det kommer til sammenhengen mellom ratioen guanin/hypoxantin og IMPDH AUC så ble det ikke observert noen klar korrelasjon verken for dag 4 eller dag 17, selv om det var en tendens til høyere ratio ved høyere IMPDH AUC (figur 34).

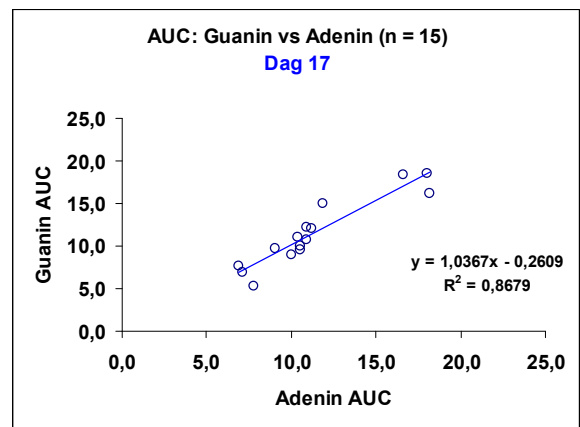
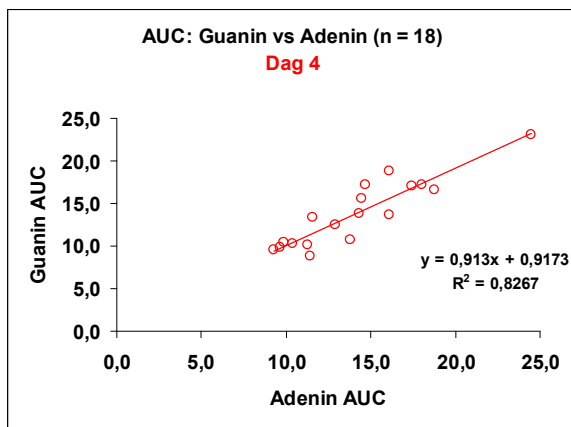


Figur 34. Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og guanin/hypoxantin ratio AUC<sub>0-4t</sub>. IMPDH AUC har enheten t\*pmol/10<sup>6</sup> celler/min mens enheten på guanin/hypoxantin ratio er t\*ratio.



Figur 35. Guanin/hypoxantin-ratio vs. IMPDH-aktivitet for alle enkeltmålinger ved henholdsvis dag 4 og dag 17. X-aksen har enheten pmol/10<sup>6</sup> celler/min mens enheten på guanin/hypoxantin ratio er ratio.

Guanin viste en god lineær korrelasjon med adenin, hvorav høyere nivåer av guanin samsvarte med høyere nivåer av adenin (figur 36).



Figur 36. Sammenheng mellom guanin og adenin  $AUC_{0-4t}$  undersøkt ved lineær regresjonsanalyse. Enheten på begge aksene er  $t \cdot \text{nmol}/10^6$  celler.

## **6. Diskusjon**

### **6.1 Validering av LC-MS/MS-metoden**

LC-MS/MS-metoden som ble brukt til å kvantifisere purinbaser, ble validert. Impresisjon, nøyaktighet, carry-over, potensiell matrikspåvirkning og linearitet ble sett på for å kartlegge påliteligheten av analyseresultatene. Enkelte av valideringsparameterne ble undersøkt innen en analyseserie, og enkelte parametere ble også undersøkt mellom flere analyseserier.

#### **6.1.1 Impresisjon og nøyaktighet**

Metoden er blitt utviklet tidligere av Vethe og blitt modifisert til den versjonen som ble brukt i denne studien. Både mellom-serie og innen-serie presisjonen var god for de målte purinbasene. Dette betyr at analysemetoden er stabil og reproduserbar og gir pålitelige målinger. Den målte IMPDH-aktivitetens innen-serie VK var meget lav, men den var relativt høy mellom seriene. Mellom-serie VK er i samme størrelsesorden som tidligere publisert for IMPDH-aktivitet av Vethe *et al* (51). Det er forventet å få større variasjon ved måling av enzymaktivitet enn å måle konsentrasjonen av analytter. En mulig forklaring på mellom-serie variasjonen på IMPDH-aktivitet er at celletallet i de forskjellige analyserte rørene muligens varierte. Andre mulige forklaringer kan være pipetteringsfeil, eller stabilitetsforskjell mellom de forskjellige brukte rør. Variasjonen kan også skyldes variabel grad av lysering av cellene under bearbeidelse av prøvene, noe som kan gi opphav til forskjellige mengder IMPDH-protein i de inkuberte prøvene.

#### **6.1.2 Carry-over**

Graden av carry-over var så lav at det anses ikke å påvirke resultatene i noe grad. Dette betyr at det ikke er nødvendig å ta hensyn til carry-over når purinbaser analyseres i pasientprøver.

#### **6.1.3 Internstandardenes korreksjon for matrikseffekt**

Da økende konsentrasjoner av analyttene ble tilsatt til vann og sammenlignet med tilsvarende tilsetninger til PBMC-lysat, gikk grafene for signalrespons versus tilsatt konsentrasjon parallelt. Stigningstallet var dermed det samme om man brukte vann eller cellemateriale som matriks. Dette indikerer at de isotopmerkede internstandardene korrigerer for matrikseffekter fra cellene, og at man dermed kan benytte vann som matriks i kalibratorene når man analyserer purininnholdet i lymfocytter som PBMC.



#### **6.1.4 Korreksjon for forekomst av xantin i IMP/NAD-løsning**

NAD inneholdt ikke spor av xantin, men i løsninger av IMP var det målbare konsentrasjoner av xantin. Dette skyldes sannsynligvis forurensninger av xantin og/eller xantinforbindelser i tørrstoffet IMP. Det ble dermed bestemt å trekke fra gjennomsnittskonsentrasjonen av xantin i tre bakgrunnsprøver tilsatt IMP/NAD. Bakgrunnsprøvene ble ellers behandlet på lik måte som de inkuberte pasientprøvene. Dette ble gjort for å korrigere for innholdet av xantin i selve IMP som ble tilsatt som substrat til IMPDH-reaksjonen. Videre fremover vil det være hensiktsmessig å undersøke om man kan få tak i renstoff av IMP som ikke inneholder xantinforurensninger.

#### **6.1.5 Linearitet for målt IMPDH-aktivitet**

IMPDH-aktivitet målt i lysat av PBMC med celletall mellom  $0,5 \times 10^6$  og  $30 \times 10^6$  celler/mL, viste akseptabel linearitet. Celletall mellom  $0,2 \times 10^6$  og  $0,5 \times 10^6$  celler/mL gav ikke god linearitet for IMPDH-målingene. Det ble bestemt å ekskludere pasientprøver med lavere celletall enn  $0,5 \times 10^6$  celler/mL eller med tilsvarende lav IMPDH-aktivitet. Enkelte pasientprøver hadde lave celletall ned til  $0,15 \times 10^6$  celler/mL, noe som kan skyldes lave leukocyttall i blodet eller avvik ved celleisolering eller celletelling.

### **6.2 Mykofenolats farmakokinetikk og farmakodynamikk**

Resultatene fra de 20 inkluderte levertransplanterte pasientene viste stor farmakokinetisk variasjon mellom pasientene. Både konsentrasjonsforløp og nivå varierte betydelig. Dette synliggjør at standarddosering til pasienter ikke er optimalt, samt at farmakokinetisk monitorering kan være et viktig verktøy for å oppnå terapeutisk konsentrasjonsnivå hos den enkelte pasient. Farmakodynamikken var også svært varierende hos den enkelte pasient og mellom pasientene. En slik intra- og interindividuell variasjon er tidligere beskrevet i litteraturen både for mykofenolats farmakokinetikk og for IMPDH (23,52). Nivåer av purinnukleotider og purinbaser er tidligere i liten grad beskrevet i celler fra transplanterte (53,54). En svakhet med studien er at kun de fire første timene etter MMF-dosering ble studert. Dermed kunne man ikke si noe om farmakokinetikk eller -dynamikk de siste åtte timene i doseintervallet på 12 timer. Følgende gikk man glipp av data på den enterohepatiske sirkuleringen av mykofenolat og hvordan denne potensielt påvirket farmakodynamikken.

### 6.2.1 Farmakokinetikk

$C_{maks}$  for total og fri mykofenolat inntraff ved median 1 time etter MMF-dosering. Dette er i tråd med det som er beskrevet i litteraturen (23).

$AUC_{0-4t}$  for total mykofenolat var ikke statistisk signifikant forskjellig ved dag 4 og dag 17. Det var en tendens til høyere AUC ved dag 17. Det var også en trend til at  $C_0$ ,  $C_{min}$  og  $C_{maks}$  økte for mykofenolat fra dag 4 til dag 17 postoperativt, men det var ikke statistisk signifikante økninger. Proteiner som albumin og bilirubin stabiliserer seg etter hvert etter transplantasjonen, og siden mykofenolat har høy grad av proteinbinding vil farmakokinetikken være mest utsatt for påvirkning i tidlig fase etter transplantasjon, men vil sannsynligvis stabilisere seg etter hvert. Benichou *et al.* har beskrevet at mykofenolat  $AUC_{0-12t}$  er lavere i tidlig fase etter levertransplantasjon på grunn av nedsatt absorpsjon og raskere eliminasjon (28). Bedring av nyrefunksjonen i tiden etter transplantasjon vil også kunne medføre økt nivå av total mykofenolat. Dette kan umiddelbart virke paradoksalt, men henger sammen med at det er metabolitten MPAG som skilles ut via nyrene. Ved nedsatt nyrefunksjon vil konsentrasjonen av MPAG i plasma stige, og MPAG vil fortrenge mykofenolat fra albumin. Dermed vil mer fri mykofenolat bli tilgjengelig for metabolisme. Når nyrefunksjonen bedres, vil altså den metabolske eliminasjonen av mykofenolat avta. Dette er sannsynligvis mest aktuelt for nyretransplanterte pasienter (23).

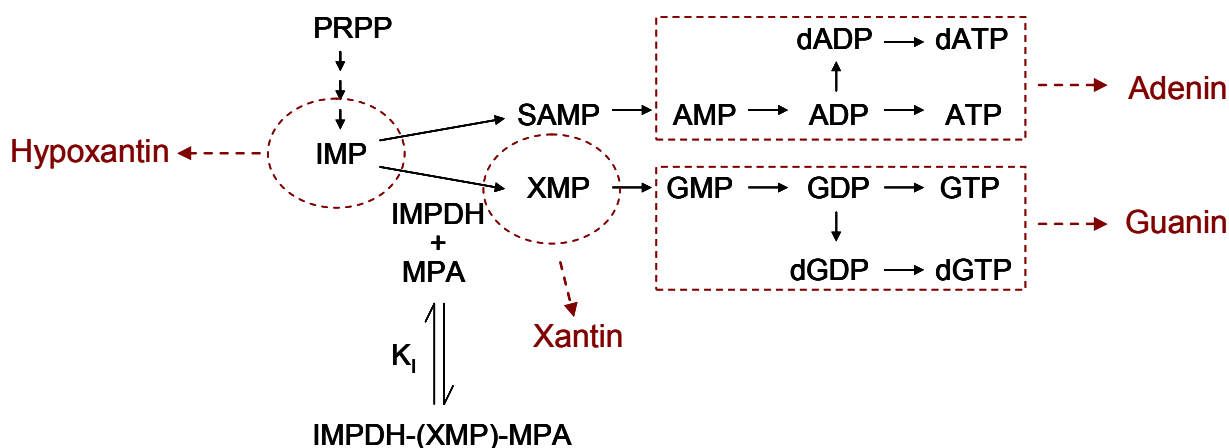
Lav plasmakonsentrasjon av albumin kort tid etter transplantasjon vil også kunne medføre midlertidig høyere fri fraksjon av mykofenolat. Dette vil som nevnt ovenfor gjøre mer mykofenolat tilgjengelig for metabolsk eliminasjon. I studien var det ikke signifikant forskjell mellom dag 4 og dag 17 for fri mykofenolat  $AUC_{0-4t}$ ,  $C_0$ ,  $C_{min}$  eller  $C_{maks}$ . Det var heller ikke noen signifikant forskjell mellom fri fraksjon mykofenolat på de to dagene. Albumin konsentrasjonen var tilsvarende for begge dagene. Det er tidligere rapportert at fri mykofenolat reduseres noe en tid etter levertransplantasjon, der forklaringen kan være at albuminkonsentrasjonen øker (28). En annen forklaring kan være at farmasøytisk albumin som brukes i tidlig fase etter transplantasjon, inneholder konserveringsstoffer som kan fortrenge mykofenolat fra albumin.

### 6.2.2 Farmakodynamikk

Hemmingen av IMPDH etter MMF-dosering forløp som forventet ut ifra tidligere studier (49,55). Maksimal hemming inntraff ved mykofenolat  $t_{maks}$  (median 1 time etter dose). Teknikken med å vaske mykofenolat ut av cellene gjorde det mulig å kalkulere hemmingsgraden av IMPDH ved  $t_0$ . Hemmingen ved dette tidspunktet, like før doseinntak, var ca 50 % og dermed betydelig. Dette er et nytt funn som indikerer at IMPDH-hemmingen vil være stor gjennom hele doseintervallet, og ikke kun i tidsrommet hvor mykofenolat er på sitt maksimale konsentrasjonsnivå. Ved mykofenolat  $t_{maks}$  var IMPDH-aktiviteten ca 20 % i forhold til basalaktiviteten som ble målt etter utvasking ut mykofenolat. Dette viser at maksimumskonsentrasjonen av mykofenolat gir svært kraftig hemming av IMPDH i lymfocytter.

Det var ikke noen signifikant forskjell mellom dag 4 og dag 17 når det gjaldt absolutt IMPDH  $AUC_{0-4t}$  eller relativ IMPDH  $AUC_{0-4t}$ . Den relative enzymaktiviteten ble for hvert tidspunkt kalkulert i forhold til basal IMPDH-aktivitet ved  $t_0$  i prøven hvor mykofenolat var vasket ut. Basalaktiviteten for IMPDH ved  $t_0$  var også tilsvarende på de to dagene. Dette vil si at det underliggende nivået av IMPDH ikke endret seg fra dag 4 til dag 17, og det gjorde heller ikke den mykofenolat-influerte enzymaktiviteten. IMPDH AUC kan være et bedre mål enn IMPDH-aktivitet målt ved enkelttidspunkter, siden  $AUC_{0-4t}$  er et totalt mål på enzymaktiviteten gjennom det studerte intervallet 0-4 timer etter dose. I denne studien ble det ikke undersøkt hvorvidt målt IMPDH-aktivitet korrelerte med avstøtningsepisoder eller bivirkninger hos de levertransplanterte. Det vil sannsynligvis være nødvendig med et større antall pasienter for å kunne si noe konklusivt om dette.

Det var forventet å observere økte nivåer av hypoxantin etter vedvarende behandling med MMF. Hypotesen var at hemming av IMPDH fører til opphopning av IMP som er substratet til IMPDH. Under prøvebearbeidelsen ble IMP hydrolysert til hypoxantin som videre ble målt ved LC-MS/MS (figur 37). Hypoxantin  $AUC_{0-4t}$  viste en tendens til økning fra dag 4 til dag 17, men økningen var ikke statistisk signifikant. Hypoxantin  $C_{min}$  og  $C_{maks}$  økte likevel signifikant fra dag 4 til dag 17.



Figur 37. *De novo* biosyntese av purinnukleotider. Inosin 5'-monofosfat (IMP) dannes via flere trinn fra fosforibosylpyrofosfat (PRPP). Videre katalyserer IMP dehydrogenase omdannelsen av IMP til xantosin 5'-monofosfat (XMP). XMP omdannes til guanosin 5'-mono/di/tri-fosfater (GMP, GDP, GTP) og deoksyvariantene av di- og trifosfatene (dGDP, dGTP). Et annet mellomprodukt fra IMP er succinyl-adenosin 5'-monofosfat (SAMP) som omdannes videre til adenin- og deoksyadenin-nukleotider (AMP, (d)ADP, (d)ATP). Hydrolyse av IMP i laboratoriet gir hypoxantin som produkt, hydrolyse av XMP gir xantin, hydrolyse av guanin-nukleotidene gir guanin, og hydrolyse av adenin-nukleotidene gir adenin.

Hypotesen var at vi ville observere reduserte nivåer av guanin etter vedvarende behandling med MMF. IMPDH omdanner IMP til XMP som videre blir til guanin- og deoksyguanin-nukleotider (målt som guanin; figur 37). Hemming av IMPDH ville derfor teoretisk føre til nedgang i guaninnivået. I tråd med dette ble det observert at guanin  $AUC_{0-4t}$  gikk signifikant ( $P < 0,05$ ) ned fra dag 4 til dag 17. Derimot ble det ikke observert noen endring av guaninnivået i løpet av intervallet på 0-4 timer etter dosering, verken for dag 4 eller dag 17. Resultatene tyder dermed på at guaninnivået ikke påvirkes umiddelbart av IMPDH-hemmingen. Guaninnivået endres likevel når dag 4 sammenlignes med dag 17. Dette peker mot at guanin påvirkes mer langsiktig av at IMPDH hemmes, og det åpner muligheten for at guanin kan være en responsmarkør for mykofenolat, men da over et lengre tidsperspektiv. Disse resultatene som viser at guaninnivået ikke blir raskt redusert etter MMF-dosering, samsvarer med tidligere resultater hvor GDP og GTP ble målt i CD4<sup>+</sup> celler fra friske personer i løpet av 0-12 timer etter MMF-dose (49). En forklaring kan være at cellene har alternative synteseveier for guanin som kompenserer for IMPDH-hemmingen. Det er også mulig at omsetningen av guanin i utgangspunktet er begrenset i sirkulerende celler som ikke prolifererer.

Det var også ønskelig å undersøke muligheten for å kombinere guanin- og hypoxantin-nivåene ved å kalkulere ratio mellom dem. En slik ratio kan potensielt fungere som mål på cellenes IMPDH-aktivitet. Guanin/hypoxantin ratio viste seg også å gi interessante resultater som kan bli nyttige i videre forskning. Ratioen ble signifikant redusert fra dag 4 til dag 17 for  $AUC_{0-4t}$ , minimumsnivå og maksimumsnivå. Dette hang sammen med at hypoxantin-nivået viste en trend til økning fra dag 4 til dag 17, mens guanin-nivået gikk ned fra dag 4 til dag 17. Hypoxantin korresponderer til IMPDHs substrat og guanin korresponderer til nedstrøms produkter. Med bakgrunn i teorien om mykofenolats virkemekanisme, der IMPDH-hemming vil kunne medføre økt hypoxantin og redusert guanin, kan man tenke seg at ratio mellom guanin og hypoxantin vil forsterke målet på den molekylære responsen av mykofenolat. Resultatene indikerer at guanin/hypoxantin ratioen kan fungere som et estimat på IMPDH-aktiviteten, men en ulempe er at raske endringer av IMPDH-aktiviteten gjennom doseintervallet ikke vil være mulig å estimere ved hjelp av ratioen.

Adenin viste ingen systematisk endring i nivået gjennom intervallet på 0-4 timer etter MMF-dosering. Men tilsvarende som for guanin sees en endring i nivået over lengre tid. Adenin  $AUC_{0-4t}$  gikk signifikant ned fra dag 4 til dag 17. Det er også verdt å merke seg at adenin og guanin i stor grad samvarierte, og i tillegg var absoluttnivåene deres svært like. Tidligere er det vist at celler som eksponeres for mykofenolat *in vitro*, vil få reduserte nivåer av ATP (48). Det er ikke kjent hvordan mekanismen bak dette er. Det kan muligens henge sammen med at cellenes generelle aktivitetsnivå reduseres, og at purinsyntesen i sin helhet påvirkes av dette.

### 6.2.3 Farmakokinetiske-farmakodynamiske vurderinger

Sammenhengen mellom total mykofenolat og absolutt IMPDH-aktivitet ( $AUC_{0-4t}$ ) sees klart både for dag 4 og dag 17. Lave konsentrasjoner av mykofenolat var nok til å gi betydelig hemming av IMPDH (figur 24). Denne sammenhengen var forventet og støttes av en god del tidligere publikasjoner som beskriver en sammenheng mellom total mykofenolatkonsentrasjon og IMPDH-aktivitet (23,29). IMPDH  $AUC_{0-4t}$  korrelerte i mindre grad med fri mykofenolat  $AUC_{0-4t}$  når man vurderte dette separat for dag 4 og dag 17. Benichou *et al.* har rapportert at total mykofenolat har mest betydning for hemming av IMPDH og dermed korresponderer med den immunsuppressive effekten, mens økt fri mykofenolat var assosiert med toksisitet.

Den relative IMPDH  $AUC_{0-4t}$  korrelerte også med total mykofenolat  $AUC_{0-4t}$  både for dag 4 og dag 17. Denne korrelasjonen synes å være tydeligere ved dag 4. Dette beskriver den relative hemmingen av IMPDH hos den enkelte pasient ved å ta hensyn til pasientens underliggende enzymaktivitet. Som for den absolutte IMPDH-aktiviteten tydet resultatene på at relativ IMPDH  $AUC_{0-4t}$  korrelerte i mindre grad med fri mykofenolat  $AUC_{0-4t}$  for begge dagene. Dette er overraskende siden man generelt regner den frie konsentrasjonen av et legemiddel som aktiv. Når man vurderer dette, er det mulig at man også bør ta hensyn til mykofenolats affinitet til albumin versus affinitet til IMPDH, samt hvor raskt mykofenolat dissosierer fra albumin og transporteres over cellemembranen. Det er tidligere beskrevet at mykofenolat har høy affinitet til IMPDH ved å virke som en såkalt ”tight-binding” inhibitor (56).

Guanin  $AUC_{0-4t}$  korrelerte verken med total eller fri mykofenolat, verken for dag 4 eller dag 17. Nivåer av guanin sett i forhold til total og fri mykofenolat er ikke tidligere undersøkt i kliniske studier. Observasjonene som indikerte at guanin ikke korrelerte med mykofenolat eller fritt mykofenolat, kan til en viss grad henge sammen med at guanin ikke påvirkes av umiddelbare endringer av mykofenolatkonsentrasjoner. I tillegg vil de underliggende nivåene av guanin variere mellom pasientene, og en slik spredning gjør det vanskeligere å se sammenhengen med effekter av mykofenolat. Det er også mulig at pasientene har variabel farmakodynamisk sensitivitet overfor mykofenolat, slik at effekten på purinbasene ikke kan sees direkte i sammenheng med mykofenolatkonsentrasjonen. Siden guanin er en purinbase som har andre biosynteseveier (resirkulering) enn *de novo* biosyntesen, så er det sannsynlig at slike alternative veier påvirker resultatene.

Det var signifikant korrelasjon mellom guanin og IMPDH  $AUC_{0-4t}$  for begge dagene. Denne korrelasjonen viser at økt aktivitet av IMPDH gir økt guanin-nivå. Adenin viser også tilsvarende god korrelasjon med IMPDH. Disse purinbasene er ikke undersøkt i kliniske studier før. Korrelasjonen mellom guanin og IMPDH var forventet ut fra kunnskap om mykofenolats virkemekanisme. Korrelasjonen mellom adenin og IMPDH lar seg ikke umiddelbart forklare, men kan tenkes å ha sammenheng med cellenes totale aktivitetsstatus og koregulert purinsyntese. Guanin viste en meget god linear korrelasjon med adenin og de to purinbasene holdt seg på samme absoluttnivå.

Guanin/hypoxantin ratioen viste en betydelig nedgang fra dag 4 til dag 17. Denne ratioen er ikke undersøkt tidligere, og det finnes derfor ingen publikasjoner som beskriver den i kliniske studier. Ratioen kan være en god parameter for å beskrive den molekylære effekten av mykofenolat. Ratioen er stabil på kort sikt gjennom intervallet på 0-4 timer, men den reduseres over lengre tid utover den postoperative fasen. Teknisk sett er det mindre krevende å måle cellulære konsentrasjoner av guanin og hypoxantin i forhold til å måle enzymaktiviteten av IMPDH. En slik prøvebearbeidelse har ikke inkubering, og dermed vil den være tidsbesparende. Guanin/hypoxantin kan ha et fortrinn fremfor IMPDH-aktivitet som biomarkør for mykofenolats farmakodynamikk, siden ratioen mellom purinbasene vil gjenspeile den farmakodynamiske konsekvensen av at IMPDH hemmes.

Svakheter med denne studien var at man ikke hadde tatt prøver før pasientene begynte å bruke MMF og at man ikke hadde en kontrollgruppe av pasienter som unngikk MMF-behandling. Hadde man tatt prøver før transplantasjon og oppstart med MMF, og samtidig hatt en kontrollgruppe, ville man hatt et sterkere grunnlag for å vurdere hvordan mykofenolat påvirket purinbasene i de CD4<sup>+</sup> cellene. Siden MMF inngår i standardbehandlingen av levertransplanterte, vil det være vanskelig å inkludere pasienter som ikke bruker dette legemidlet. Et alternativ kunne være å gjøre en sammenlignende studie i friske personer, men i dette tilfellet måtte forsøkspersonene bruke det immundempende legemidlet over lengre tid, noe som kan påvirke deres immunstatus og potensielt føre til bivirkninger. Utgangspunktet for hovedstudien var ikke å studere purinbaser, og studiedesignet var derfor ikke optimalt for å vurdere mykofenolats effekt på disse metabolittene. Derfor må man ikke se på resultatene som konklusive, men heller som hypotesegenererende for fremtidige studier.

## 7. Konklusjon

LC-MS/MS-metoden som ble brukt til å kvantifisere purinbaser, viste akseptabel presisjon og nøyaktighet under valideringen. Analysemetoden kan brukes til å måle IMPDH-aktivitet og nivåene av hypoxantin, guanin og adenin i lymfocytter.

Det var stor farmakokinetisk variasjon mellom de levertransplanterte pasientene. I pasientgruppen endret ikke total og fri mykofenolat  $AUC_{0-4t}$  seg fra dag 4 til dag 17, og  $C_{maks}$  inntraff ved median 1 time etter dosering på begge dagene.

IMPDH-aktivitet og purinbaser ble målt i CD4+ celler fra de levertransplanterte pasientene. Det var stor farmakodynamisk variasjon mellom pasientene. IMPDH  $AUC_{0-4t}$  var ikke signifikant forskjellig ved dag 4 og dag 17. Maksimal hemming av IMPDH inntraff samtidig med mykofenolat  $C_{maks}$ . Imidlertid ble det ikke observert systematiske endringer av purinbasenivåene innenfor intervallet 0-4 timer etter dosering av MMF. Hypoxantin  $AUC_{0-4t}$  viste en tendens til høyere nivå ved dag 17, men dette var ikke statistisk signifikant. Hypoxantin  $C_{min}$  og  $C_{maks}$  økte derimot signifikant fra dag 4 til dag 17. Både guanin og adenin  $AUC_{0-4t}$  var signifikant redusert ved dag 17 sammenlignet med dag 4. Adenin og guanin viste stor grad av samvariasjon. Det var også signifikant korrelasjon mellom guanin og IMPDH  $AUC_{0-4t}$  ved begge dagene. Resultatene fra studien viser at IMPDH påvirkes umiddelbart av mykofenolat, mens det er mulig at purinbasene blir påvirket av IMPDH-hemmingen i et mer langsiktig tidsperspektiv.

Ratio mellom guanin og hypoxantin viste en signifikant nedgang fra dag 4 til dag 17. Ratioen kan være et nyttig mål på mer langsiktige, molekylære effekter av mykofenolat i tidlig fase etter transplantasjon, men den gjenspeiler ikke den umiddelbare IMPDH-hemmingen som mykofenolat utøver i løpet av et doseintervall.

Det ble observert tydelig sammenheng mellom total mykofenolat og IMPDH-aktivitet ved både dag 4 og dag 17 etter transplantasjon. Det ble også sett en sammenheng mellom fri mykofenolat og IMPDH-aktivitet, men da tydeligst med de relative IMPDH-verdiene.

Funnene i denne studien har pekt i retning av at guanin eller guanin/hypoxantin ratio kan være aktuelle markører for å beskrive den immunsuppressive effekten av det potente legemidlet mykofenolat. Disse markørene vil da gi uttrykk for de molekylære effektene av mykofenolat



over noen dager/uker fram til de farmakokinetisk-farmakodynamiske forholdene stabiliserer seg i tidlig fase etter levertransplantasjon. Endelige konklusjoner om egnetheten av IMPDH-aktivitet, guanin og guanin/hypoxantin ratio som biomarkører for effekten av mykofenolat, kan først slås fast ved større kliniske studier av disse potensielle biomarkørene.

## 8. Referanser

1. Bakkan, P.A. (2010). "Årsrapport for organdonasjon og transplantasjon 1.januar – 31.desember 2010." Oslo universitetssykehus.
2. Scholz, T., Karlsen, T.H., Sanengen, T., Schrumpf, E., Line, P.D., Boberg, K.M., et al. (2009). "Levertransplantasjon i Norge gjennom 25 år." *Tidsskr Nor Lægeforen*. 129: 2587-2592.
3. "Protokoll for levertransplantasjon ved Rikshospitalet." (2009). Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet.
4. Parham, P. (2009). "The immune system." 3. utg. Taylor & Francis Group, Informa.
5. Afzali, B., Lechler, R.I., Hernandez-Fuentes, M.P. (2007). "Allorecognition and the alloresponse: clinical implications." *Tissue Antigens*. 69: 545-556.
6. "Protokoll for nyre- og pankreastransplantasjon ved Rikshospitalet." (2010). Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet.
7. Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids." *Clin Pharmacokinet*. 44: 61-98.
8. "Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics." 9. utg. (1996). The McGraw-Hill Companies.
9. "Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell." (2010). Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.
10. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. (2007). "Pharmacology.", 6. utg. Churchill Livingstone Elsevier.
11. Kapturczak, M.H., Meier-Kriesche, H.U., Kaplan, B. (2004). "Pharmacology of calcineurin antagonists." *Transplant Proc*. 36: 25S-32S.
12. Haddad, E.M., McAlister, V.C., Renouf, E., Malthaner, R., Kjaer, M.S., Gluud, L.L. (2006). "Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients." *Cochrane Database Syst Rev*. CD005161.
13. Wallemacq, P., Armstrong, V.W., Brunet, M., Haufroid, V., Holt, D.W., Johnston, A., et al. (2009). "Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference." *Ther Drug Monit*. 31: 139-152.
14. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." *Drugs*. 67: 369-391.
15. Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B., Gurkan, A., et al. (2007). "Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation." *N Engl J Med*. 357: 2562-2575.

16. Budde, K., Becker, T., Arns, W., Sommerer, C., Reinke, P., Eisenberger, U., et al. (2011). "Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial." *Lancet*. 377: 837-847.
17. Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2006). "The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments." *Ther Drug Monit*. 28: 720-725.
18. Hager, P.W., Collart, F.R., Huberman, E., Mitchell, B.S. (1995). "Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding." *Biochem Pharmacol*. 49: 1323-1329.
19. Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G., Suzuki, K. (1990). "Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase." *J Biol Chem*. 265: 5292-5295.
20. Jain, J., Almquist, S.J., Ford, P.J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E., et al. (2004). "Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes." *Biochem Pharmacol*. 67: 767-776.
21. Bremer, S., Mandla, R., Vethe, N.T., Rasmussen, I., Rootwelt, H., Line, P.D., et al. (2008). "Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after transplantation and initiation of immunosuppression." *Transplantation*. 85: 55-61.
22. Allison, A.C., Eugui, E.M. (2005). "Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection." *Transplantation*. 80: S181-S190.
23. Staatz, C.E., Tett, S.E. (2007). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." *Clin Pharmacokinet*. 46: 13-58.
24. Reine, P.A., Kongsgaard, U.E., Andersen, A., Thogersen, A.K., Olsen, H. (2008). "Infusion of albumin attenuates changes in serum protein binding of drugs in surgical patients compared with volume replacement with HAES." *Acta Anaesthesiol Scand*. 52: 406-412.
25. Meier-Kriesche, H.U., Shaw, L.M., Korecka, M., Kaplan, B. (2000). "Pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal insufficiency." *Ther Drug Monit*. 22: 27-30.
26. Girard, H., Court MH, Bernard, O., Fortier, L.C., Villeneuve, L., Hao, Q., et al. (2004). "Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver." *Pharmacogenetics*. 14: 501-515.
27. Kuypers, D.R., Naesens, M., Vermeire, S., Vanrenterghem, Y. (2005). "The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients." *Clin Pharmacol Ther*. 78: 351-361.
28. Benichou, A.S., Blanchet, B., Conti, F., Hornecker, M., Bernard, D., Taieb, F., et al. (2010). "Variability in free mycophenolic acid exposure in adult liver transplant

- recipients during the early posttransplantation period." *J Clin Pharmacol.* 50: 1202-1210.
29. Minmin, S., Zhidong, G., Hao, C., Weixia, Z., Baiyong, S., Bing, C., et al. (2010). "Correlation between pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in liver transplant patients." *J Clin Pharmacol.* 50: 1388-1396.
  30. Hesselink, D.A., van Hest, R.M., Mathot, R.A., Bonthuis, F., Weimar, W., de Bruin, R.W., et al. (2005). "Cyclosporine interacts with mycophenolic acid by inhibiting the multidrug resistance-associated protein 2." *Am J Transplant.* 5: 987-994.
  31. Mandla, R., Midtvedt, K., Line, P.D., Hartmann, A., Bergan, S. (2006). "Mycophenolic acid clinical pharmacokinetics influenced by a cyclosporine C2 based immunosuppressive regimen in renal allograft recipients." *Transpl Int.* 19: 44-53.
  32. Picard, N., Premaud, A., Rousseau, A., Le, M.Y., Marquet, P. (2006). "A comparison of the effect of ciclosporin and sirolimus on the pharmacokinetics of mycophenolate in renal transplant patients." *Br J Clin Pharmacol.* 62: 477-484.
  33. Schmidt, L.E., Rasmussen, A., Norrelykke, M.R., Poulsen, H.E., Hansen, B.A. (2001). "The effect of selective bowel decontamination on the pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in liver transplant recipients." *Liver Transpl.* 7: 739-742.
  34. Naderer, O.J., Dupuis, R.E., Heinzen, E.L., Wiwattanawongsa, K., Johnson, M.W., Smith, P.C. (2005). "The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil." *J Clin Pharmacol.* 45: 219-226.
  35. Goutelle, S., Mialou, V., Gouraud, A., Parant, F., Bleyzac, N. (2011). "Probable drug interaction between intravenous ciprofloxacin and mycophenolate mofetil in a bone marrow transplant recipient." *Pharmacotherapy.* 31: 37e-40e.
  36. Schaier, M., Scholl, C., Scharpf, D., Hug, F., Bonisch-Schmidt, S., Dikow, R., et al. (2010). "Proton pump inhibitors interfere with the immunosuppressive potency of mycophenolate mofetil." *Rheumatology (Oxford).* 49: 2061-2067.
  37. Bullingham, R., Shah, J., Goldblum, R., Schiff, M. (1996). "Effects of food and antacid on the pharmacokinetics of single doses of mycophenolate mofetil in rheumatoid arthritis patients." *Br J Clin Pharmacol.* 41: 513-516.
  38. Kuypers, D.R., Verleden, G., Naesens, M., Vanrenterghem, Y. (2005). "Drug interaction between mycophenolate mofetil and rifampin: possible induction of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase." *Clin Pharmacol Ther.* 78: 81-88.
  39. Naesens, M., Kuypers, D.R., Streit, F., Armstrong, V.W., Oellerich, M., Verbeke, K., et al. (2006). "Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients." *Clin Pharmacol Ther.* 80: 509-521.
  40. Annapandian, V.M., John, G.T., Mathew, B.S., Fleming, D.H. (2009). "Pharmacokinetic interaction between sodium valproate and mycophenolate in renal allograft recipients." *Transplantation.* 88: 1143-1145.

41. Mele, T.S., Halloran, P.F. (2000). "The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients." *Immunopharmacology*. 47: 215-245.
42. Song, A.T., Abdala, E., Bonazzi, P.R., Bacchella, T., Machado, M.C. (2006). "Does mycophenolate mofetil increase the risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients?--A mini-review." *Braz J Infect Dis*. 10: 132-138.
43. Anderka, M.T., Lin, A.E., Abuelo, D.N., Mitchell, A.A., Rasmussen, S.A. (2009). "Reviewing the evidence for mycophenolate mofetil as a new teratogen: case report and review of the literature." *Am J Med Genet A*. 149A: 1241-1248.
44. Le Meur, Y., Buchler, M., Thierry, A., Caillard, S., Villemain, F., Lavaud, S., et al. (2007). "Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation." *Am J Transplant*. 7: 2496-2503.
45. van Gelder, T., Le Meur, Y., Shaw, L.M., Oellerich, M., DeNofrio, D., Holt, C., et al. (2006). "Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation." *Ther Drug Monit*. 28: 145-154.
46. Wieland, E., Olbricht, C.J., Susal, C., Gurrachaa, P., Bohler, T., Israeli, M., et al. (2010). "Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients." *Ther Drug Monit*. 32: 560-572.
47. Raggi, M.C., Siebert, S.B., Steimer, W., Schuster, T., Stangl, M.J., Abendroth, D.K. (2010). "Customized mycophenolate dosing based on measuring inosine-monophosphate dehydrogenase activity significantly improves patients' outcomes after renal transplantation." *Transplantation*. 90: 1536-1541.
48. Vethe, N.T., Bremer, S., Bergan, S. (2008). "IMP dehydrogenase basal activity in MOLT-4 human leukaemia cells is altered by mycophenolic acid and 6-thioguanosine." *Scand J Clin Lab Invest*. 68: 277-285.
49. Vethe, N.T., Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. (2008). "Pharmacodynamics of Mycophenolic Acid in CD4(+) Cells: A Single-Dose Study of IMPDH and Purine Nucleotide Responses in Healthy Individuals." *Therapeutic Drug Monitoring*. 30: 647-655.
50. Vethe, N.T., Mandla, R., Line, P.D., Midtvedt, K., Hartmann, A., Bergan, S. (2006). "Inosine monophosphate dehydrogenase activity in renal allograft recipients during mycophenolate treatment." *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 66: 31-44.
51. Vethe, N.T., Bergan, S. (2006). "Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy." *Therapeutic Drug Monitoring*. 28: 608-613.
52. Weimert, N.A., Derotte, M., Alloway, R.R., Woodle, E.S., Vinks, A.A. (2007). "Monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker for mycophenolic acid effect: potential clinical implications." *Ther Drug Monit*. 29: 141-149.

53. Devyatko, E., Zuckermann, A., Bohdjalian, A., Roedler, S., Dunkler, D., Grimm, M., et al. (2006). "Activation of the purine salvage pathway in mononuclear cells of cardiac recipients treated with mycophenolate mofetil." *Transplantation*. 82: 113-118.
54. Jagodzinski, P., Lizakowski, S., Smolenski, R.T., Slominska, E.M., Goldsmith, D., Simmonds, H.A., et al. (2004). "Mycophenolate mofetil treatment following renal transplantation decreases GTP concentrations in mononuclear leucocytes." *Clin Sci (Lond)*. 107: 69-74.
55. Glander, P., Budde, K. (2010). "Target enzyme activity as a biomarker for immunosuppression." *Ther Drug Monit*. 32: 257-260.
56. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., Natsumeda, Y. (1993). "Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases." *J Biol Chem*. 268: 27286-27290.